

# ANNALES

DE

# L'INSTITUT PASTEUR

---

## SUR L'IMMUNITÉ PARA-SPÉCIFIQUE CONFÉRÉE PAR LE BCG

par A. CALMETTE et A. SAENZ

*(Institut Pasteur. Laboratoires de recherches sur la Tuberculose.)*

Depuis que la vaccination préventive de la tuberculose par le BCG a été introduite dans la pratique, et surtout à partir de l'année 1926, les médecins et les vétérinaires ont été maintes fois surpris de constater que les enfants et que les jeunes animaux vaccinés se montraient généralement beaucoup plus résistants que les non vaccinés à diverses maladies du jeune âge. A mesure que leurs observations se multipliaient, on s'est rendu compte de ce fait que la mortalité générale des vaccinés était constamment moindre, — et cela dans tous les pays, — que celle des non vaccinés appartenant aux mêmes groupes et placés dans les mêmes conditions d'existence. Ce phénomène paraissait inexplicable, car la différence entre la mortalité des vaccinés et celle des non vaccinés dépassait manifestement, et de beaucoup, la mortalité attribuable à la seule infection tuberculeuse. Il fallait donc admettre :

a) Ou bien que la mortalité tuberculeuse du premier âge était

en réalité bien plus considérable que ne l'indiquent les statistiques; on pouvait se demander, par exemple, si un bon nombre de décès d'enfants attribués à diverses affections, telles que broncho-pneumonies, entérites, convulsions, athrepsies, etc..., ne devaient pas, en réalité, malgré l'absence de lésions affirmée par l'autopsie, être portés au compte d'une infection mixte dans laquelle le virus tuberculeux avait une responsabilité jusqu'alors insoupçonnée par les anatomo-pathologistes comme par les cliniciens. Mais c'était là une hypothèse qu'aucun fait expérimental, qu'aucune découverte nécropsique n'ont justifiée jusqu'à présent.

b) Ou bien que la vaccination BCG conférait aux sujets qui la reçoivent, outre l'immunité spécifique vis-à-vis des surinfections bacillaires virulentes, une sorte particulière de résistance ou d'immunité qu'on peut qualifier de *para-spécifique* vis-à-vis de diverses infections complètement étrangères à la tuberculose.

Cette seconde hypothèse nous semblait, *a priori*, plus vraisemblable parce que nous connaissions d'autres faits dont l'analogie est saisissante. Tel est, par exemple, celui qu'a signalé A. Ascoli à la Commission réunie à Paris, en octobre 1928, sous les auspices de la Société des Nations, pour l'étude du BCG, relatif au phénomène auquel il a donné le nom d'*Anachorèse*.

A. Ascoli avait observé que les jeunes bovins vaccinés avec le BCG se montraient presque réfractaires à la pneumonie contagieuse des jeunes veaux qui fait, parmi les non vaccinés, de grands ravages dans les étables de Lombardie. Il pensa alors que le BCG produisait sans doute une sorte de réaction locale de dérivation, ou d'appel d'autres germes infectieux, comparable à celle que déterminent les abcès de fixation.

Si cette interprétation du phénomène signalé par A. Ascoli est discutable, — et nous y reviendrons plus loin, — le fait en lui-même ne saurait être contesté. Il n'est d'ailleurs pas isolé. Nous pourrions en citer beaucoup d'autres. Ceux qui suivent méritent d'être particulièrement retenus.

\* \*

Dans une lettre adressée le 6 août 1880 à son ancien maître J.-B. Dumas, Pasteur disait son étonnement d'avoir constaté que



lorsqu'on filtrait les milieux de culture où s'était développé le microbe du choléra des poules, ces milieux étaient devenus impropres à la culture de la bactérie charbonneuse. « Il se pourrait donc, écrivait-il, que les poules vaccinées pour le choléra fussent réfractaires au charbon. *Ceserait l'immunité charbonneuse créée sur un animal au moyen d'une maladie parasitaire de tout autre nature...* Si ce résultat se confirme, et principalement s'il se généralise pour d'autres maladies virulentes, on pourra en espérer les conséquences thérapeutiques les plus importantes en ce qui concerne même la pathologie des maladies virulentes propres à l'espèce humaine (1). »

Nous allons voir que cette vision prophétique de Pasteur s'est, en fait, maintes fois réalisée.

Il y a près de quarante ans, en 1894, R. Pfeiffer montrait que les cobayes auxquels on injecte une petite quantité de sérum normal d'homme ou de cheval deviennent souvent réfractaires à l'infection cholérique par voie péritonéale.

L'année suivante, l'un de nous, au cours de recherches sur l'abrine, toxine végétale de l'*Abrus precatorius* (*Jequirity*), observait, d'une part, que les lapins, rendus réfractaires à de fortes doses de venin, supportaient sans malaise 2 milligrammes d'abrine, dose capable de tuer 5 lapins neufs de même poids ; d'autre part (avec Marchoux), que les lapins vaccinés contre l'abrine devenaient extraordinairement résistants à l'infection charbonneuse, bien que le sérum anti-abrique n'exerce par lui-même aucune action bactéricide sur les cultures de charbon.

Un phénomène analogue nous était révélé en étudiant la rage. Les lapins vaccinés contre le venin se montrent généralement réfractaires à l'inoculation intra-oculaire du virus rabique. Inoculés par trépanation, ils prenaient la rage, mais avec un retard constant de deux jours sur les témoins.

De leur côté, L. Cruveilhier, avec S. Nicolau et L. Kopciowska (2), à l'Institut Pasteur, ont vu que la vaccination antirabique exerce une influence activante très marquée sur l'élaboration de divers anticorps microbiens non spécifiques, antityphiques par exemple.

(1) *Œuvres de Pasteur*, éditées par L. Pasteur Vallery Radot, vol. VI, p. 315. Masson, éditeur, Paris. (*Sous presse*)

(2) *Soc. de Biologie*, 106, 1931, p. 212.

Puisque le venin, l'abrine, le virus rabique, exercent leur action toxique ou infectieuse sur les cellules nerveuses, on peut penser qu'il s'agit là de faits analogues à ceux que nous connaissons depuis les beaux travaux de Métalnikov, et ceux de Speransky, démontrant les relations étroites du système nerveux avec les processus d'immunité.

D'autres expérimentateurs ont également fourni des exemples d'immunité non spécifique. Busson (1) a constaté que l'immunité antivariolique entraîne chez le cobaye une augmentation de résistance vis-à-vis du virus rabique des rues, et G. A. Schiavone (2) a rapporté une statistique de 53 cas de coqueluche dans lesquels une vaccination antivariolique suivie de succès avait fait cesser rapidement les quintes de toux.

Zernoff (3), injectant des cultures chauffées de divers microbes, de bouillon ou de sérum de cheval, à des chenilles de *Galleria melonella*, trouve que ces chenilles acquièrent ainsi l'immunité contre divers microbes très pathogènes pour leur espèce. John Sugg et James Mill (4) démontrent que l'injection d'un sérum antilevure (*Saccharomyces cerevisiæ*) à la souris préserve cet animal contre l'infection pneumococcique du type II. Nakado et Arifiku (5) confèrent aux cobayes une résistance semblable vis-à-vis de l'infection typhique en leur injectant préalablement des cultures tuées de divers microbes : pneumocoques, bacilles pesteux, paratyphiques, dysentériques, *B. coli*, etc. L'effet protecteur de ces injections de cadavres microbiens est plus ou moins marqué, mais toujours net, et il apparaît après un délai d'environ cinq jours.

Beaucoup d'autres faits nous ont appris que chez des animaux préparés avec un antigène déterminé, la production des anticorps spécifiques est favorisée — souvent même considérablement accrue — par une infection intercurrente ou par l'injection d'un antigène étranger.

C'est ainsi que Clark, Zellmer et Stone (6) ayant vacciné des lapins par injections de cultures de staphylocoques, de strepto-

(1) *Wien. Klin. Woch.*, n° 46, 1926.

(2) *La Semana Medica*, n° 49, 4 décembre 1930.

(3) *Soc. de Biol.*, 106, 1931, p. 151.

(4) *Bull. Inst. Pasteur*, 1929, p. 962.

(5) *Zeitsch. f. Immunitätsforschung*, 70, p. 1, mars 1931.

(6) *Bull. Inst. Pasteur*, 1922, p. 939.



coques ou de pneumocoques, constatent que lorsqu'ils leur injectent ensuite des cultures de bacilles typhiques, ils produisent dans le même temps des agglutinines trois fois plus actives que les témoins. Meta L. Schrøder (1), un peu plus tard, observait un fait analogue : l'injection d'hématies de mouton à des lapins porteurs d'abcès sous-cutanés spontanés (dont il ne précise pas l'étiologie), provoque une formation d'hémolysines quatre à vingt fois plus abondantes que chez les lapins neufs ; et alors que l'infection expérimentale par le staphylocoque n'élève pas le taux des hémolysines, ce taux se trouve notablement accru par les inoculations de pneumocoque ou d'extrait aqueux de ce microbe.

Les belles recherches de G. Ramon l'ont conduit à de nombreuses constatations du même genre. Il les a mises à profit pour favoriser dans des proportions considérables la formation des antitoxines chez les chevaux producteurs de divers sérums thérapeutiques (mélanges de corps microbiens tués ou de corps étrangers tels que le tapioca, et de toxines ou d'anatoxines), ou pour l'obtention de l'immunité chez l'homme (vaccinations mixtes : anatoxines et corps microbiens tués).

Il est enfin impossible de ne pas rappeler — et ceci nous ramène à l'« anachorèse » d'Ascoli — que la thérapeutique anti-infectieuse par les « abcès de fixation » à l'essence de térébenthine, préconisés jadis par Fochier, a joui pendant bien des années d'une grande vogue. Celle-ci, d'après les travaux expérimentaux récents de R. F. Le Guyon (2) et de J. Albert-Weil (3), à Strasbourg, ne semblerait pas justifiée. Cependant Nestorescu (4) a montré que, du moins chez le chien, sous l'influence de l'abcès provoqué, on voit s'accroître le taux de l'alexine, des hémolysines et des agglutinines du sérum normal.

Mais ce qui nous intéresse principalement ici, pour l'interprétation du phénomène d'immunité para-spécifique si généralement signalé à la suite des vaccinations antituberculeuses, c'est de rechercher quelle peut être l'influence de l'infection bacillaire virulente d'une part, celle de la vaccination BCG

(1) *Bull. Inst. Pasteur*, 1925, p. 211.

(2) *Soc. de Biol.*, 107, 1931, p. 43.

(3) *Thèse de Strasbourg*, 1931, p. 141.

(4) *Soc. de Biol.*, 102, 1929, p. 120.

d'autre part, sur la formation des anticorps et sur la résistance aux infections non tuberculeuses.

\*  
\* \*

Tous les cliniciens qui se sont occupés de l'étude de la tuberculose ont signalé les effets nocifs, aggravants, de certaines infections surajoutées ou intercurrentes. Les vétérinaires et les expérimentateurs ont fait maintes fois la même observation. Chacun sait que la tuberculose expérimentale évolue et se généralise beaucoup plus vite chez les cobayes infectés avec d'autres microbes (pseudo-tuberculose, pasteurelloses, etc.) ou intoxiqués par divers poisons. Il semble cependant que certaines autres maladies exercent une action antagoniste vis-à-vis de l'infection bacillaire et inversement. On a remarqué, par exemple, que les épidémies graves d'influenza restent bénignes chez les malades tuberculeux des sanatoriums ou les épargnent presque totalement.

Sur le terrain expérimental, Toshi Hirayama (1) a comparé la marche de l'infection charbonneuse chez les cobayes neufs et chez les cobayes inoculés préalablement depuis dix à trente jours avec des bacilles tuberculeux virulents par voie péritonéale, intraveineuse ou sous-cutanée. La moitié environ des cobayes infectés de charbon guérit; les autres succombent avec des retards marqués sur les témoins qui meurent tous. Le même expérimentateur a fait des constatations semblables en comparant l'évolution du charbon chez les cobayes vaccinés avec le BCG et chez les cobayes neufs. Dans notre laboratoire, Ninni et de Sanctis Monaldi (2) ont confirmé ces faits et montré que les animaux prémunis avec le BCG depuis au moins quatre semaines sont beaucoup plus résistants vis-à-vis de la bactérie charbonneuse que ceux qui n'ont reçu le BCG que depuis quinze jours. L'infection tuberculeuse accroît également la résistance des cobayes à l'égard du streptocoque.

Les mêmes expérimentateurs ont établi dans un autre travail (3) que la vaccination BCG confère aux cobayes une

(1) *Zeits. f. Immunitätsforsch.*, 63, fasc. 3-4, 1930.

(2) *Soc. de Biol.*, 107, 1931, p. 1246.

(3) *Soc. de Biol.*, 109, 9 avril 1932, p. 1091.



résistance très nette contre l'infection subaiguë à bacille de Bang. Cette résistance se manifeste, non seulement par une diminution de la mortalité (50 p. 100), mais aussi par une élimination ou une destruction rapide et complète du bacille de Bang dans l'organisme. Par contre, le BCG n'augmente pas sensiblement la résistance des animaux vis-à-vis de l'intoxication diphtérique. Cette différence paraît indiquer que la cause de l'immunité para-spécifique due au BCG (anti-infectieuse et non antitoxique) est attribuable à des facteurs cellulaires et non à des modifications humorales.

D'autre part, M. Nasta et A. Weinberg (1) ont vu que la production des hémolysines anti-mouton est sensiblement accrue, doublée et même triplée par la vaccination BCG effectuée un mois auparavant chez le lapin, tandis que les agglutinines anti-vibron cholérique et les précipitines anti-sérum de cheval ne sont pas influencées. Lewis et Loomis (2) avaient fait antérieurement une constatation semblable chez les cobayes infectés de tuberculose virulente. Ils en obtenaient des hémolysines anti-mouton vingt fois plus actives que chez les cobayes neufs.

\*  
\* \*

Les faits qui précèdent — et nous pourrions en rappeler beaucoup d'autres analogues — suffisent à montrer que, de même que certaines infections favorisent ou aggravent d'autres infections — telle l'infection streptococcique associée à la diphtérie — il existe des maladies microbiennes virulentes ou atténuées au cours ou à la suite desquelles on voit s'établir, non seulement une immunité spécifique, mais aussi une résistance manifeste à l'égard d'autres infections de nature ou d'origines très différentes. Cette résistance si singulière, que nous proposons de dénommer *immunité para-spécifique*, est particulièrement marquée et évidente à la suite de la vaccination BCG. Nous allons en fournir quelques exemples tirés, les uns de nos cahiers d'expériences, les autres des observations cliniques qui ont été obligeamment transmises à l'un de nous par les nombreux médecins qui, depuis plus de huit ans, apportent à nos

(1) *Soc. de Biol.*, 1931, p. 992.

(2) *Bull. Inst. Pasteur*, 1924, p. 853.

laboratoires de recherches sur la tuberculose les résultats de leur expérience pratique en même temps que leur fidèle et précieuse collaboration.

\*  
\* \*

Dans un mémoire publié par ces *Annales* en 1931 (1), en cherchant à vérifier les faits annoncés par Hormaèche et Mackinnon (de Montevideo) — et depuis reconnus inexacts, — relatifs à l'exaltation de virulence du BCG dans l'organisme des cobayes infectés par le *Streptococcus caviæ*, l'un de nous eut l'occasion d'entreprendre une longue série d'expériences sur les effets, immédiats ou tardifs, des inoculations de streptocoques et de bacilles de Preisz-Nocard aux animaux antérieurement vaccinés contre la tuberculose.

Bornons-nous à en rappeler ici les conclusions :

« Ni l'infection lymphatique produite par le bacille de Preisz-Nocard, ni l'infection aiguë ou chronique, locale ou générale, provoquée par le *Streptococcus caviæ* (culture issue de la souche utilisée par Hormaèche et Mackinnon dans leurs expériences), ne modifient les propriétés du BCG, que celui-ci soit inoculé avant ces germes, ou simultanément, ou ultérieurement, par la même voie ou par des voies différentes.

« L'inoculation préalable d'une dose massive de BCG par voie péritonéale (de 50 à 100 milligrammes) protège le cobaye dans une mesure très appréciable contre une infection streptococcique de faible intensité ».

Ces résultats, confirmant ceux qu'avaient déjà obtenus, avec des streptocoques de diverses origines, Tzeknowitzer à Khar-koff, Nélis à Bruxelles, Moreau à Montevideo, démontraient que l'éclosion d'une maladie intercurrente ne provoque aucune exaltation des propriétés pathogènes du BCG et qu'une diminution de la résistance organique ne réussit pas à rendre nocive la vaccination antituberculeuse.

Nous avons eu, d'autre part, l'occasion de constater que le BCG protège aussi, dans une mesure assez appréciable, contre l'infection streptococcique naturelle.

Dans des expériences de vaccination BCG que nous n'avons

(1) Ces *Annales*, 47, sept. 1931, p. 221.



pas encore publiées, 16 cobayes témoins, qui avaient reçu seulement les bacilles virulents d'épreuve, ont succombé dans les délais de cinq à dix-sept jours, à des maladies intercurrentes. Chez 3 d'entre eux nous avons isolé, par ponction du cœur, un streptocoque hémolytique très virulent pour le cobaye. Ces témoins cohabitaient dans la même cage que 28 cobayes vaccinés par le BCG. Or un seul de ces derniers est mort et son sang ne contenait pas le streptocoque hémolytique.

Le BCG protège aussi contre l'infection naturelle produite par le pneumocoque. Dans des expériences de vaccination par inhalation du BCG, que nous poursuivons avec L. Costil et que nous rapporterons ultérieurement, nous avons relevé les faits suivants :

15 cobayes préalablement préparés par plusieurs séances d'inhalation de BCG sont éprouvés, en même temps que 10 témoins, le 21 décembre 1932, également par inhalation d'une émulsion très ténue de bacilles virulents. Témoins et vaccinés avaient sensiblement le même poids lors de l'épreuve. Le jour où celle-ci eut lieu, les uns et les autres furent placés en cohabitation étroite dans les mêmes cages. A cette époque de l'année, beaucoup de nos animaux succombaient à diverses maladies épizootiques, en particulier pneumococcie et *Pasteurellæ*.

Parmi les 15 vaccinés, un seul est mort vingt-cinq jours après l'épreuve virulente, de congestion pulmonaire avec pneumocoques. Sur les 10 témoins, 9 ont été victimes de l'épizootie et ont succombé entre le quatorzième et le trente-troisième jour après l'épreuve virulente. Plusieurs d'entre eux présentaient des formes graves d'infection péritonéale et pulmonaire avec des pseudo-membranes couvrant le foie et la rate et un exsudat verdâtre extrêmement riche en pneumocoques.

Selon toute vraisemblance une protection analogue se produit vis-à-vis de l'infection artificielle, mais nous n'avons pas pu nous en assurer parce que les cultures de pneumocoques isolées de nos cobayes se sont montrées ensuite peu virulentes pour les animaux neufs.

Les faits qui précèdent sont, par eux-mêmes, assez démonstratifs de l'existence d'une immunité para-spécifique produite par la vaccination BCG vis-à-vis de diverses infections expérimentales.

\*  
\* \*

L'immunité para-spécifique produite par la vaccination BCG chez les enfants a retenu l'attention d'un grand nombre de phtisiologues et de pédiatres qui ont déjà une assez longue pratique de cette méthode. Les témoignages des savants étrangers tels que L. Sayé (Barcelone), E. Malvoz et J. Van Beneden (Liège), Heynsius van den Berg (Amsterdam), C. Naeslund (Suède), de Assis (Rio de Janeiro), etc..., concordent pour démontrer que la mortalité générale des vaccinés est toujours notablement moindre que celle des non vaccinés.

Pour le professeur Cantacuzène et ses collaborateurs M. Nasta et T. Veber en Roumanie, où plus de 150.000 enfants ont été vaccinés jusqu'à présent, l'impression générale des médecins est que la vaccination exerce une action manifestement *eutrophique*.

« D'après notre expérience, — écrivaient-ils dans leur rapport de 1932, — l'accroissement de la résistance générale chez les vaccinés ne peut plus souffrir aucune discussion. La mortalité générale infantile de la naissance à un an qui, chez les non vaccinés, est, en Roumanie, de 20 p. 100 en moyenne, n'est plus que de 8 p. 100 chez les vaccinés. Le bénéfice de la résistance non spécifique conférée par la vaccination se prolonge bien au delà de la première année de la vie et se fait encore nettement sentir à la fin de la troisième année. »

En France, où le nombre des enfants vaccinés depuis 1924 approche de 600.000, beaucoup de médecins ont recueilli et nous ont transmis les observations les plus probantes à cet égard. Nous en reproduisons ici quelques-unes, choisies parmi celles qui nous ont été le plus récemment adressées par des confrères qui ont vacciné leurs propres enfants et qui n'avaient pas été touchés par la récente enquête faite par l'Institut Pasteur en septembre 1932 (1).

Docteur P. B. (Paris).

« Ma fille cadette A., née le 12 octobre 1926, a pris les trois doses de BCG les troisième, cinquième et septième jours après

(1) Ces *Annales*, 49, novembre 1932, *Supplément*.



la naissance. Elle a été revaccinée par voie buccale à l'âge d'un an. C'est une enfant superbe, résistante, se défendant contre les multiples infections du jeune âge beaucoup mieux que ses frères et sœurs nés avant la naissance du BCG, malheureusement ! Elle a eu les oreillons, la varicelle, la coqueluche, la scarlatine sans aucun incident. Chez elle, on a l'impression que les moyens de défense sont supérieurs à ceux des enfants du même âge non vaccinés. »

*Docteur J. C. (Paris).*

« Notre foyer, après avoir vu l'effroyable drame de nous voir ravir, en 1926, *en moins de trois mois, nos trois enfants* (six ans, trois ans, cinq mois) à la suite d'une contamination domestique, a eu la joie de voir un nouveau poupon venir l'égayer enfin un peu, le 23 juillet 1931. Ce cher petit bonhomme a été vacciné par le BCG à sa naissance et isolé un mois. Je me permets, à la faveur des points de comparaison que nous avons avec nos trois aînés, de vous résumer ainsi mon appréciation :

« Type d'enfant nettement *renforcé* ; dentition plus précoce (première dent au centième jour, seize dents à quatorze mois) ; s'est tenu debout dans son parc à onze mois ; a marché seul à quatorze mois et demi, autant d'avance sensible sur son frère et l'aînée de ses sœurs. L'impression générale de passer ses premiers mois avec facilité ; moins fragile. Je ne peux pas mieux dire que de répéter le mot *renforcé*. L'aspect général moins « poupard », moins empâté, plus en muscle, type plus long. En somme, tout ceci ne fait que confirmer en *tous* points l'impression générale de nos 282 confrères consultés. »

*Docteur L. N. (Vieux-Marché, Côtes-du-Nord).*

« J'ai vacciné avec le BCG 4 de mes enfants : les sixième, septième, huitième et neuvième, nés respectivement les 7 juin 1925, 19 mars 1927, 16 février 1929 et 11 mai 1932. Ce sont des enfants plus vigoureux que leurs aînés non vaccinés. Ils n'ont jamais été malades. Quelques petites indispositions passagères et c'est tout. »

*Docteur A. M. (Merdrignac, Côtes-du-Nord).*

« Dans une famille de 6 enfants, très aisée, le père, médecin,

n'exerce pas. Les enfants sont, bien entendu, très surveillés. Sur 4 non vaccinés, l'un est mort à sept ans de méningite bacillaire; 2 sont des ganglionnaires à poussées fébriles fréquentes, à teint pâle. Les deux derniers, vaccinés au BCG, sont resplendissants de santé. Pas un jour d'indisposition en quatre ans. Le contraste est frappant entre ces deux derniers et leurs aînés. »

*Docteur P. (Concarneau, Finistère).*

« Les enfants vaccinés sont généralement plus vigoureux que les non vaccinés placés dans les mêmes conditions. Des enfants vaccinés dans des familles tuberculeuses, dont les frères et les sœurs sont morts de méningite bacillaire ou sont adénopathiques, se portent parfaitement bien. »

Il est superflu de multiplier les citations. Elles répètent les mêmes faits, en termes à peu près identiques. Et ce ne sont pas seulement les médecins qui affirment cette résistance des enfants vaccinés aux maladies du jeune âge : ce sont aussi les familles et les administrations d'assistance. Le vice-président du Bureau de Bienfaisance de Béziers (Hérault), par exemple, nous écrit à la date du 17 janvier 1933 : « Depuis le 1<sup>er</sup> novembre 1926, 3.699 enfants ont été vaccinés à Béziers, soit 73,6 p. 100 des naissances. On constate d'une manière générale que les enfants vaccinés sont plus robustes, mieux portants, et les parents se félicitent d'avoir eu recours à cette mesure préventive. »

Par conséquent, l'existence d'une immunité para-spécifique chez les sujets comme chez les animaux vaccinés contre la tuberculose par le BCG est si généralement — on peut même dire si universellement — constatée, qu'il n'est plus possible de la nier.

Comment expliquer sa genèse?

Nous avons déjà dit que les faits expérimentaux étudiés à l'Institut Pasteur dans nos laboratoires de recherches sur la tuberculose par Ninni et de Sanctis Monaldi, de même que ceux que nous ont révélés les travaux de Métalnikov et de Speransky, ne permettent pas de croire que ce phénomène si étrange soit lié à une action spéciale des humeurs des sujets



vaccinés. Il s'agit certainement ici, soit d'effets d'imprégnation lente des cellules nerveuses, centrales et périphériques, par les poisons bactériens produits par le BCG et qui rendent ces cellules moins sensibles à d'autres poisons, soit d'une excitation progressivement exacerbée des cellules phagocytaires, mobiles et fixes, qui permet à celles-ci de s'adapter à la digestion intracellulaire de microbes pourvus d'une certaine virulence mais moins résistants à cette digestion intracellulaire que le bacille tuberculeux.

C'est cette dernière hypothèse qui, en l'état actuel de nos connaissances, satisfait le mieux notre esprit.

#### CONCLUSIONS.

Il est démontré par l'expérimentation sur les animaux, comme par l'observation clinique, que les sujets prémunis contre l'infection tuberculeuse par l'injection sous-cutanée ou intraveineuse, ou par l'absorption par voie buccale du vaccin BCG, deviennent, après un délai de quelques semaines (quatre à cinq généralement), résistants, non seulement aux surinfections bacillaires virulentes, mais aussi à diverses infections étrangères à la tuberculose telles que celles que déterminent les streptocoques, les pneumocoques, le *Bacillus abortus* de Bang, la bactériémie charbonneuse.

C'est à ce phénomène d'immunité para-spécifique surajoutée à l'immunité spécifique antituberculeuse qu'il faut attribuer la résistance évidente à diverses maladies du jeune âge que présentent les enfants et les jeunes animaux vaccinés avec le BCG dès après leur naissance.

Cette résistance explique les écarts si notables, partout signalés, entre la mortalité générale (par toutes causes de maladies) des enfants vaccinés et celle des enfants non vaccinés exposés aux mêmes sources de contagion, élevés dans les mêmes conditions et entourés des mêmes soins.

## LA VACCINATION ASSOCIÉE (ANTITYPHO-PARATYPHOÏDIQUE ET ANTIDIPHTÉRIQUE) DANS L'ARMÉE

par M. DOPTER, Médecin-Général Inspecteur.

La diphtérie a toujours été, dans l'armée, une des infections les plus rebelles à tous les moyens prophylactiques utilisés pour en avoir raison. Elle n'a pas désarmé malgré l'application raisonnée des méthodes scientifiques sur lesquelles les plus grands espoirs avaient été fondés. Son évolution dans le temps en apporte la preuve la plus évidente : la morbidité diphtérique oscillait en effet, durant les années qui ont immédiatement précédé la guerre, entre 0,87 et 1,50 pour un effectif de 1.000 hommes ; les mesures prises, déjà dès cette époque, pour lutter contre le pouvoir contagieux non seulement des malades, mais des porteurs de germes, n'avaient donc pu arriver à abaisser sensiblement le chiffre annuel des atteintes ; mais il est une constatation plus décevante encore : c'est qu'après les hostilités cette morbidité a subi un accroissement progressif qui la porta, en 1920, à 2,28 p. 1.000 et en 1926 à 8,78 ; malgré le déclin observé en 1929 (6,39), on a donc assisté ainsi à une recrudescence manifeste qui, en raison des efforts réalisés pour la maîtriser, prend la signification d'une véritable faillite des moyens employés jusqu'alors.

La vigilance du Service de Santé de l'armée ne s'est cependant pas trouvée en défaut ; partout où la diphtérie régnait, cette prophylaxie a été appliquée rigoureusement : dépistage des atteintes avérées ou même frustes, isolement des malades, recherche des porteurs de germes, isolement et traitement de ces derniers, désinfection de tout ce qui a pu être contaminé par les premiers comme par les seconds. Et cependant, dans ce milieu militaire, où la discipline apporte une aide puissante à toutes les tentatives réalisées en vue de s'opposer à l'extension des maladies infectieuses, la diphtérie leur a résisté et



s'est même accrue en des proportions importantes. L'augmentation de la morbidité diphtérique envisagée en général, mais aussi lors de l'étude des faits particuliers, démontre en effet de la façon la plus formelle que les mesures prises se sont le plus souvent montrées ou inopérantes, ou pour le moins insuffisantes. Si en certains cas elles ont paru être couronnées de succès, telle n'a pas toujours été la règle : la plupart du temps, elles ont tout au plus contribué à atténuer dans des proportions très variables le pouvoir de diffusion de l'infection. Par ailleurs, les exemples ne manquent pas où la diphtérie s'est attachée avec ténacité pendant des années, soit à un corps de troupe qu'elle a suivi dans tous ses déplacements, soit à une garnison, voire même à une région tout entière.

La raison de cette insuffisance des moyens prophylactiques les plus rationnellement appliqués réside à vrai dire dans les difficultés auxquelles on se heurte pratiquement en certaines circonstances pour appliquer intégralement les mesures prescrites : si certaines unités réduites peuvent en bénéficier, les unités importantes, composées de plusieurs centaines de sujets, échappent davantage à leur action ; la surveillance bactériologique, pour ne parler que de cette dernière, y est assurément moins aisée à exercer. D'autre part les agglomérations qu'il s'agit de préserver restent fatalement, quoi qu'on fasse, en contact avec la population civile dont le degré d'infection est plus ou moins élevé ; les militaires peuvent à tout moment y puiser le bacille de Löffler ; le germe spécifique réapparaît ainsi à la caserne à l'insu de tous, alors que l'exécution consciencieuse de la prophylaxie classique pouvait permettre d'envisager sa disparition. On s'explique ainsi les retours désespérants d'une infection que l'on combattait sans grand succès avec des armes sur l'efficacité desquelles on croyait pouvoir compter.

Les conséquences d'une morbidité diphtérique élevée sont sérieuses quand on se place au double point de vue militaire et budgétaire.

Sans avoir besoin d'insister ici sur des considérations de cet ordre, le Service de Santé Militaire ne pouvait rester indifférent aux constatations qui précèdent ; et puisque les mesures classiques ne se montraient pas capables d'avoir raison de la ténacité de la diphtérie une fois qu'elle s'était implantée dans

un régiment, puisqu'elles étaient pour ainsi dire impuissantes à protéger l'individu contre la contagion, il convenait de prendre le problème sous une autre face ; sans toutefois abandonner la lutte contre le bacille diphtérique, il fallait tenter de le résoudre en rendant réfractaires les organismes qui sont si aisément exposés à ses méfaits ; la vaccination antidiphtérique, telle qu'elle avait été conçue par Ramon, était tout indiquée pour espérer atteindre ce but ; fort des notions déjà établies sur l'emploi et l'efficacité de l'anatoxine, on ne pouvait qu'en escompter d'heureux résultats.

### Application de la vaccination antidiphtérique.

Déjà en 1927, la Direction du Service de Santé avait réglé provisoirement les modalités d'application de la vaccination antidiphtérique. Mais on avait estimé, à cette époque, que celle-ci ne pouvait être recommandée et appliquée qu'aux seuls volontaires ; toutefois, en cas de nécessité absolue, de même aussi en cas d'urgence, le Ministre restait juge de la décision à prendre, du moins en ce qui concernait la mise en œuvre de la vaccination collective.

Or, jusqu'en 1930, malgré l'accroissement constaté de la diphtérie, cette vaccination collective n'avait pas été prescrite. Il ne fut en effet pratiqué jusqu'alors que des vaccinations individuelles, plus particulièrement chez les infirmiers et dans les familles d'officiers et de sous-officiers.

Au début de 1930 cependant, en février, l'attention fut attirée par certains faits qui étaient de nature à imposer l'application collective de la méthode : 3 corps de troupe subissaient les méfaits de la diphtérie depuis plusieurs mois, l'un d'eux depuis plusieurs années, sans que les méthodes classiques de prophylaxie eussent paru apporter un résultat appréciable ; il s'agissait du 9<sup>e</sup> régiment de cuirassiers à Lyon, du 15<sup>e</sup> bataillon de chasseurs alpins à Barcelonnette, du 2<sup>e</sup> régiment de zouaves à Oudjda. D'autres étaient atteints, mais en de moindres proportions ; c'est sur les premiers que l'application de mesures énergiques s'imposait pour avoir raison d'une situation qui menaçait de se prolonger. Celle-ci, d'ailleurs, se compliquait



du fait qu'un contingent de jeunes soldats allait être incorporé en avril. Or, il est de règle que chaque incorporation nouvelle est suivie à brève échéance d'une poussée diphtérique. On devait donc particulièrement redouter, dans ces trois régiments, une recrudescence plus ou moins marquée de la diphtérie aux dépens des nouveaux arrivés; des organismes neufs au regard du bacille de Lœffler ne pouvaient manquer de s'infecter au contact de camarades plus anciens, parmi lesquels la diphtérie sévissait en permanence, et de payer à cette infection un tribut plus ou moins important.

La seule détermination à prendre vis-à-vis d'eux était la vaccination préventive à l'anatoxine.

Au demeurant, comme ces jeunes recrues devaient obligatoirement subir préalablement la vaccination antitypho-paratyphoïdique, il fut décidé de leur appliquer la vaccination associée : T. A. B. + anatoxine. Cette mesure était de nature à simplifier les opérations de vaccination en les faisant bénéficier en une seule fois de l'une et de l'autre; elle permettait de limiter les difficultés inhérentes aux nécessités de l'instruction; enfin elle autorisait l'espoir d'une immunité solide, ainsi qu'on pouvait en juger par les quelques faits déjà connus.

Ramon (1) en effet avait montré que, chez les chevaux destinés à la production de sérum antidiphtérique ou antitétanique soumis à l'immunisation par les anatoxines correspondantes, le pouvoir antigène de ces dernières était accru par l'addition de poudre de tapioca; cette substance irritante provoque au point d'inoculation une légère inflammation locale qui favorise un accroissement sensible du taux de l'antitoxine spécifique dans le sérum des animaux ainsi traités. Les injections vaccinales mélangées au tapioca ne pouvant être envisagées pour l'espèce humaine en raison de la réaction qu'elles provoquent, Ramon et Zoeller (2) ont eu l'idée d'utiliser la réaction locale que produit généralement l'injection de vaccin T. A. B.; à leurs yeux, ce dernier, par l'irritation causée, devait pouvoir jouer le rôle du tapioca vis-à-vis de l'anatoxine.

(1) G. RAMON. *Académie des Sciences*, 1925, p. 157.

(2) G. RAMON et ZOELLER. *Société de Biologie*, 10 janvier 1926, p. 106, et *Paris Médical*, 10 juin 1926, p. 539.

En effet, l'expérience tentée chez des sujets qui reçurent des injections de ce mélange confirma leur pensée : déjà, après la deuxième injection, la réaction de Schick positive devient négative dans 90 p. 100 des cas ; le taux de 100 p. 100 fut atteint après la troisième ; par conséquent non seulement la présence du vaccin T. A. B. ne nuisait pas à l'installation de l'immunité antidiphtérique, mais elle était de nature à la favoriser.

Des résultats du même ordre ont été recueillis par L. Martin, Loiseau et Laffaille (1), après des essais tentés chez les élèves d'une Ecole d'Infirmières visiteuses de Paris. Celles d'entre ces dernières dont la réaction de Schick était positive, et qui n'avaient pas été antérieurement atteintes de fièvre typhoïde, ont été soumises aux injections du mélange T. A. B. + anatoxine à parties égales dont 1, 2, 3 cent. cubes furent injectés de quinze en quinze jours. Les réactions observées se montrèrent sensiblement égales à celles qu'on observe couramment, soit avec le T. A. B., soit avec l'anatoxine injectée seule. Le résultat fut le suivant : chez 19 élèves ayant reçu le mélange en 3 injections, la réaction de Schick recherchée une vingtaine de jours après la troisième, de positive qu'elle était avant les injections du mélange vaccinant, redevint négative dans tous les cas.

Dans la suite Zoeller (2) a rapporté les résultats de ses recherches pratiquées dans une institution sur 217 sujets de sept à vingt ans. Une première injection fut pratiquée à l'aide du mélange T. A. B. + anatoxine (anatoxine =  $1/2$  cent. cube ; T. A. B. : dose variable suivant l'âge) ; elle fut suivie à trois semaines d'intervalle d'une deuxième et troisième injection d'anatoxine seule (1 cent. cube et 1 c. c.  $1/2$ ). Les réactions consécutives à l'injection du mélange ne furent pas plus marquées qu'avec le T. A. B. seul. Au point de vue de l'immunité obtenue, tous les sujets ainsi vaccinés présentaient deux mois après un Schick négatif (soit 100 p. 100).

En ce qui concerne la diphtérie, l'immunité était donc conférée ; restait à savoir si l'immunité antitypho-paratyphoïdique était également acquise ; en l'absence d'un critérium biolo-

(1) L. MARTIN, LOISEAU et LAFFAILLE. *Ces Annales*, septembre 1928, p. 1060.

(2) ZOELLER. *Académie de Médecine*, 30 octobre 1928.



gique donnant toute garantie à cet égard, il était difficile d'en juger autrement que par la recherche du taux d'agglutination présenté par le sérum. Or le pouvoir agglutinant de ce dernier vis-à-vis des germes de la série typhique s'est montré égal à celui qu'on observe habituellement chez les vaccinés par le T. A. B. seul (L. Martin, Loiseau et Laffaille). Cette constatation était de nature à appuyer l'opinion de Ramon et Zoeller, aux yeux desquels l'association de deux vaccins essentiellement différents dans leur essence ne gênait aucunement leur pouvoir antigène spécifique.

D'après ces données, il était permis d'espérer que l'application de cette vaccination associée aux jeunes soldats devant être incorporés dans des régiments déjà contaminés par la diphtérie contribuerait, sinon à arrêter, du moins à diminuer en des proportions importantes la morbidité diphtérique, sans altérer l'immunité que devait leur faire acquérir la vaccination antitypho-paratyphoïdique.

**DISPOSITIONS GÉNÉRALES.** — Il fut décidé tout d'abord de ne vacciner, parmi les jeunes soldats, que les sujets reconnus réceptifs, condition essentielle à la non-production de trop fortes réactions. D'où la nécessité de les soumettre préalablement à la réaction de Schick, dès leur incorporation.

Ceux dont le Schick était négatif, par conséquent réfractaires d'après les notions universellement admises, devaient subir uniquement la vaccination au T. A. B. dans les conditions habituelles. Ceux dont le Schick était reconnu positif devaient être soumis à la vaccination associée : T. A. B. + anatoxine diphtérique. L'anatoxine a été mise obligeamment à ma disposition par Ramon : d'après les données fournies par sa méthode de la floculation, elle titrait 10 unités anatoxiques au centimètre cube.

**TECHNIQUE.** — Trois injections du mélange des deux vaccins dans les conditions et proportions suivantes :

Première injection = 1 cent. cube de T. A. B. + 1/2 cent. cube d'anatoxine.

Deuxième injection = 1 cen'. cube de T. A. B. + 1 cent. cube d'anatoxine.

Troisième injection = 1 c. c. 1/2 d'anatoxine seule.

Chaque sujet vacciné devait donc recevoir 30 unités anatoxiques de l'anatoxine utilisée.

Le mélange des deux vaccins devait être effectué extemporanément en aspirant successivement dans la même seringue le T. A. B. puis l'anatoxine, respectivement aux doses indiquées.

Les injections devaient être pratiquées, après les précautions aseptiques habituelles, dans le tissu cellulaire sous-cutané de la région sous-épineuse.

L'intervalle entre les injections fut fixé à dix-huit ou vingt et un jours entre la première et la deuxième, et à quinze jours entre la deuxième et la troisième.

CONTRE-INDICATIONS. — L'attention des médecins désignés pour pratiquer cette vaccination fut attirée sur les contre-indications, celles-ci restant les mêmes que celles qui étaient déjà connues à l'endroit de chacune de ces vaccinations.

Certains vaccinateurs ont pris l'initiative d'effectuer des rhino-vaccinations (1) chez les sujets porteurs de ces contre-indications ; simple pis-aller, car ce mode d'immunisation est souvent infidèle.

RÉACTIONS CONSÉCUTIVES. — Les réactions observées n'ont pas présenté d'intensité supérieure à celles qu'on observe avec le T. A. B. seul. Elles ont consisté, dans l'immense majorité des cas, dans un léger empâtement de la région injectée avec douleur locale légère peu marquée et une légère gêne dans les mouvements du bras ; au point de vue général, on a observé de la céphalée avec élévation thermique faible et fugace.

Le plus souvent la deuxième injection a été suivie d'une réaction moins forte que la première ; après la troisième elle a été plus légère encore.

Donc, réactions banales et bénignes dans l'immense majorité des cas. Il y a lieu de signaler cependant quelques rares réactions fébriles plus marquées (39° à 39°5 dans les quelques heures consécutives à l'injection) ; mais cette hyperthermie n'a été le plus souvent que très passagère ; tout est rentré dans

(1) MEERSEMAN. *Archives de médecine militaire*, janvier 1932.



l'ordre, en général, au bout de vingt-quatre à quarante-huit heures au plus. D'autre part, plusieurs sujets ont présenté après la première injection une réaction rénale qui s'est traduite par une albuminurie passagère, accompagnée ou non d'une légère oligurie avec présence de quelques hématies dans l'urine, sans cylindrurie. Dans les quelques cas ainsi constatés, cette complication n'a laissé après elle aucun trouble dans le fonctionnement rénal. Il était évidemment indiqué, en pareil cas, d'interrompre la vaccination par la voie sous-cutanée et de la remplacer, ici encore, par la rhino-vaccination.

Ainsi comprise, la vaccination associée a d'abord été appliquée en avril 1930 aux recrues appelées à servir dans les trois régiments sur lesquels l'attention avait été attirée, puis sur les jeunes soldats de deux autres unités arrivés en octobre 1930.

Les résultats observés à la suite de ces essais furent si probants au regard de l'immunité conférée et de la prophylaxie de la diphtérie que la méthode fut étendue, en avril puis en octobre 1931, enfin en avril 1932, à de nombreux régiments à l'époque de l'incorporation.

Enfin quelques essais ont été tentés, en vue de simplifier les opérations de vaccination, avec la méthode nouvelle que Ramon et ses collaborateurs ont récemment fait connaître (anatoxine renforcée).

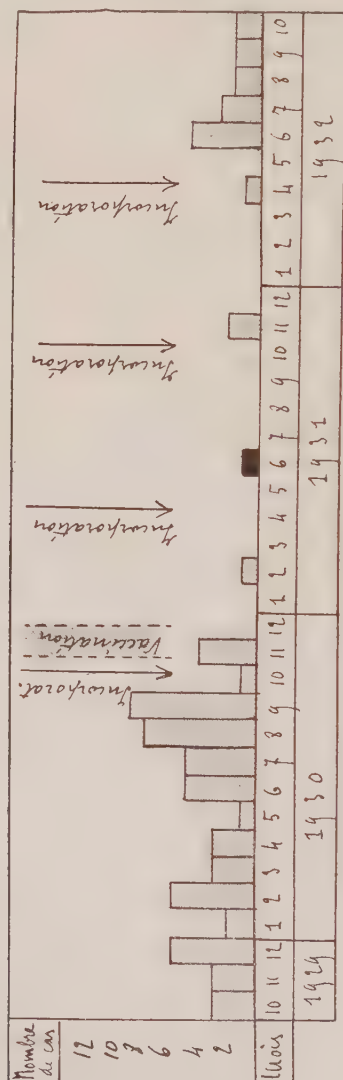
## I. — Résultats obtenus dans les divers régiments.

La campagne de prophylaxie par la vaccination associée a été ainsi poursuivie chez les jeunes soldats réceptifs de quarante et un régiments. Les uns et les autres se trouvaient, au regard de la diphtérie, dans une situation différente suivant le degré d'endémie qui y régnait en permanence.

L'exposé qui suit traduit uniquement et sans commentaires la façon dont elle s'est comportée sous l'influence de la méthode préventive utilisée dans chaque cas particulier ; les enseignements qu'il y aura lieu de tirer de la description rapide des faits observés feront ensuite l'objet d'une étude de synthèse où il sera possible de dégager les notions essentielles qui doivent être mises en évidence :

5<sup>e</sup> RÉGIMENT DE CUIRASSIERS A PONTOISE (graphique n° 4). — La diphtérie régnait à l'état endémo-épidémique dans ce régiment depuis plusieurs années.

Déjà, quand il était en garnison à Trèves, le 5<sup>e</sup> cuirassiers lui payait



GRAPHIQUE N° 4. — Pontoise : 5<sup>e</sup> régiment de cuirassiers.

Nombre mensuel de cas de diphtérie avant et après vaccination.

Teinte grise : cas de diphtérie chez des sujets non vaccinés ou vaccinés incomplètement.  
En noir : cas de diphtérie chez les sujets ayant reçu la vaccination complète.

annuellement un fort tribut. En 1929, de janvier à septembre inclus, 35 cas s'étaient déjà produits. A cette époque, il part de Rhénanie, et vient tenir garnison à Pontoise en fin septembre. La diphtérie l'accompagne, et ne lâche pas prise malgré le changement de climat, si bien que d'octobre 1929

au 1<sup>er</sup> octobre 1930 on comptait 34 atteintes malgré l'application rigoureuse des mesures prophylactiques classiques. Aussi, la vaccination associée fut-elle prescrite.

*Vaccination.* — Les trois injections furent pratiquées les 5 et 25 novembre et le 1<sup>er</sup> décembre 1930 sur 225 jeunes soldats déclarés réceptifs par une réaction de Schick positive.

*Résultats.* — 3 cas de diphtérie se déclarèrent au cours de la vaccination :

1 cas le 20 novembre, chez un jeune soldat après la première injection ;

1 cas le 22 novembre, chez un jeune soldat, Schick négatif ;

1 cas le 24 novembre, chez un ancien soldat non vacciné ;

1 cas le 25 novembre, chez un jeune soldat qui ne reçut qu'une injection.

Depuis lors, 4 cas seulement firent éclosion dans le courant de 1931 :

L'un, le 3 février, chez un jeune soldat qui n'avait reçu qu'une injection, en raison d'une hospitalisation nécessitée, peu après, par une atteinte de congestion pulmonaire.

Le second apparut en juin chez un vacciné à trois injections (donc sept mois après la vaccination complète).

Enfin, 2 en novembre chez des hommes incorporés en avril précédent et non vaccinés.

Malgré l'absence de nouvelles vaccinations qui n'avaient pas été jugées utiles en raison de la disparition presque complète de l'endémie diphtérique, le début de l'année 1932 continua à se passer sans incidents. En avril, cependant, 1 cas se présenta, suivi à partir de juin d'une reprise de faible importance : 5 cas en juin, 3 en juillet et 1 au cours de chacun des mois suivants ; en présence de cette poussée de 11 cas à la veille de l'incorporation d'octobre 1932, de nouvelles vaccinations des jeunes recrues ont été prescrites pour cette époque.

7<sup>e</sup> BATAILLON DE CHASSEURS ALPINS A ALBERTVILLE (graphique n° 2). — Ce bataillon était infecté depuis janvier 1930. On n'observa toutefois au début que des atteintes clairsemées qui s'échelonnaient de mois en mois et semblaient entretenues par l'état endémo-épidémique régnant dans la population civile.

A partir du mois de mai se déclare une assez forte poussée à laquelle les jeunes soldats, arrivés le 15 avril, paient leur tribut ; du 12 mars au 18 juin, on comptait 36 cas.

On décide alors d'effectuer sur tout l'effectif du bataillon une recherche complète des porteurs de germes ; elle est pratiquée du 25 juin au 6 juillet ; 607 prélèvements furent effectués tout d'abord ; les sujets indemnes furent soumis à un deuxième prélèvement huit jours après.

Sur ces 607, après le premier prélèvement, 53 porteurs sains furent décelés ; après le deuxième prélèvement, 9. Au total, 62 porteurs sains, soit 10,24 p. 100, ce pourcentage élevé reflétant le degré d'infection dont le bataillon était le siège. Ces porteurs furent isolés pendant toute la durée de leur portage.

Malgré ces mesures l'infection diphtérique, tout en s'atténuant, ne cède pas ; tant à la portion centrale que pendant le séjour aux manœuvres, on observe encore de juillet à novembre l'éclosion de 17 cas.

En présence de la persistance de l'état d'endémie qui a succédé à l'état épidémique et menace les jeunes soldats dès leur arrivée en fin octobre, la vaccination associée est prescrite.

*Vaccination.* — Pour les soustraire le plus possible à l'infection qui règne à Albertville et les éloigner du foyer, on les rassemble à Bourg-Saint-Mau-



rice, mais les nécessités de l'encadrement obligent à leur adjoindre une centaine d'anciens soldats provenant d'Albertville.

Les trois injections furent pratiquées les 8 et 26 novembre et 11 décembre 1930, 116 hommes déclarés réceptifs reçurent ainsi la vaccination complète



GRAPHIQUE N° 2. — Albertville : 7<sup>e</sup> bataillon de chasseurs alpins. (Même légende.)

Résultats. — Du 3 au 24 novembre, 7 cas se déclarèrent : 4 chez d'anciens soldats venus d'Albertville à Bourg-Saint-Maurice pour les besoins de l'encadrement ; 3 chez de jeunes soldats, dont 2 à Schick négatif et 1 n'ayant reçu que la première injection de vaccin mixte.

Depuis le 24 novembre, on n'enregistre qu'un nouveau cas en février chez un non-vacciné.

La morbidité étant devenue presque nulle, il n'était pas question de répéter la vaccination parmi le contingent d'avril 1931. Toutefois, à la demande du commandement local lui-même, qui fit valoir ses craintes de voir les recrues payer leur tribut, en raison de la morbidité qui continuait à se manifester en ville, la vaccination fut prescrite. De cette façon tous les éléments réceptifs du bataillon (anciens et jeunes soldats) devaient être immunisés.

Le résultat de cette *deuxième vaccination* fut des plus heureux, car jusqu'en septembre 1931 4 cas seulement apparurent, dont 1 seul (déclaré en octobre) avait subi la vaccination complète.

Une *nouvelle vaccination* est prescrite par mesure de précaution pour l'arrivée du contingent d'octobre 1931. Depuis, 2 cas se sont produits, l'un le 25 décembre 1931, l'autre le 14 mars 1932, chez des sujets qui n'avaient pu être vaccinés.

Enfin, une *quatrième vaccination* est appliquée au contingent d'avril 1932. Aucune nouvelle atteinte n'a plus été constatée depuis lors.

15<sup>e</sup> BATAILLON DE CHASSEURS ALPINS A BARCELONNETTE (graphique n° 3). — Ce bataillon n'avait présenté depuis 1926 que des atteintes clairsemées; 2 cas en 1926, 3 en 1927, 4 en 1928.

Le 25 juillet 1929, le bataillon part en manœuvres dans la région de Saint-Paul-sur-Ubaye; 2 angines blanches se produisent, suivies au mois d'août par une explosion brutale de 17 diphthéries, qui fait prendre la décision d'interrompre les manœuvres; d'où retour du bataillon dans sa garnison.

Au cours de cette épidémie, 26 porteurs de germes avaient été décelés et isolés; c'est sans doute à leur libération hâtive que, après une accalmie passagère, la diphthérie fit une nouvelle réapparition en novembre (10 cas) pour fournir en décembre 47 cas, dont 1 décès (collapsus cardiaque), et 17 atteintes ultérieures pendant les mois qui suivirent.

En présence de cet état d'infection déclaré depuis neuf mois, et malgré le déclin qui se dessinait, mais par crainte d'un retour offensif aux dépens des recrues, de même aussi en raison de la persistance de la diphthérie dans la population civile, la vaccination est prescrite.

Pour soustraire le plus possible les jeunes soldats à l'infection du bataillon, ces derniers sont groupés à Jausiers, encadrés par des anciens reconnus non-porteurs de germes.

*Vaccination* — La vaccination associée débute le 5 mai 1930; elle est terminée le 10 juin. 66 hommes reçoivent la première injection; 59 de ces derniers reçoivent la deuxième et la troisième.

*Résultats*. — A partir de mai, la diphthérie ne se manifesta plus que sous la forme de deux atteintes isolées; celles-ci se déclarèrent l'une en juin, l'autre en juillet, toutes deux chez de jeunes soldats non vaccinés (Schick négatif).

Ce furent les seules jusqu'à l'incorporation suivante (octobre); une nouvelle vaccination à cette époque ne parut donc pas nécessaire.

Mais peu après cette incorporation, la diphthérie fait à nouveau son apparition: 2 en novembre, 1 en décembre. Ce fut l'amorce d'une nouvelle poussée qui débuta en janvier 1931 pour donner jusqu'en octobre 31 cas.

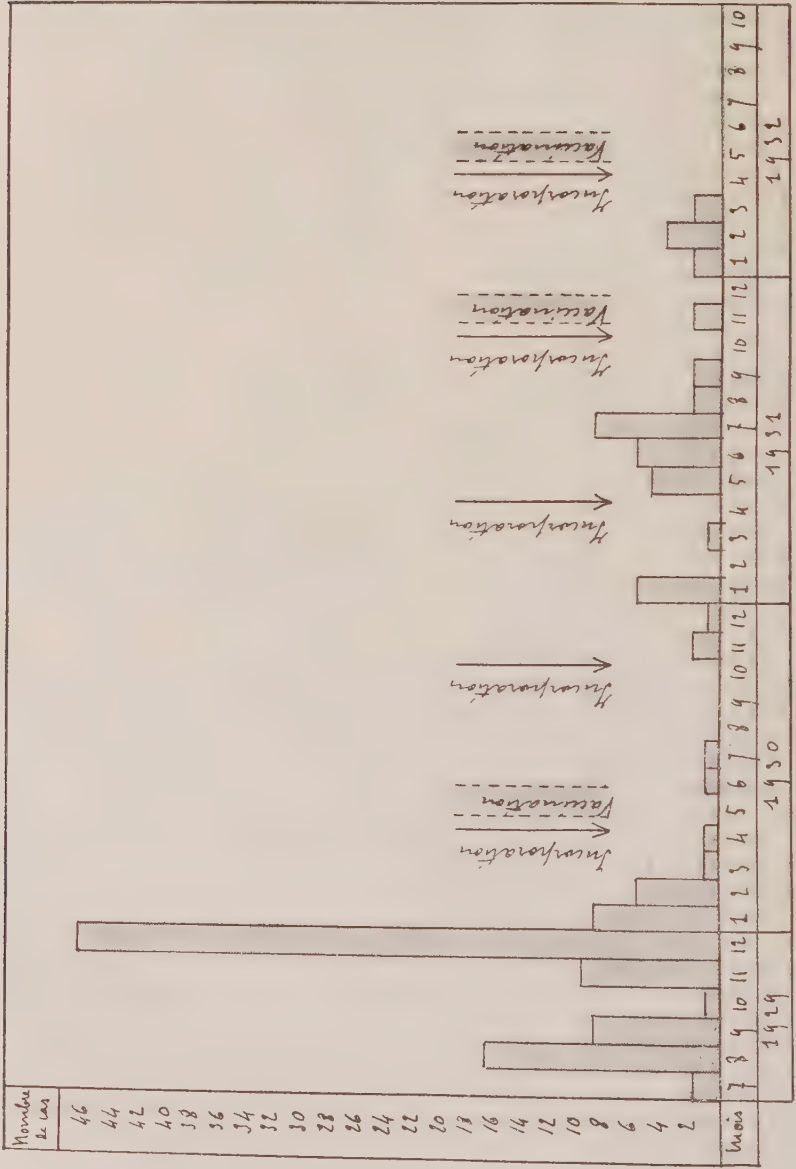
Dans ces conditions, une *nouvelle vaccination* est appliquée sur les recrues incorporées en octobre 1931.

Le résultat fut le suivant:

2 cas surviennent du 6 au 10 novembre, l'un chez un vacciné à une injection, l'autre chez un non-vacciné.

2 cas en janvier 1932, 4 en février, 2 en mars chez des non-vaccinés.

Au total 10 cas, dont 9 chez des non-vaccinés, et 1 chez 1 vacciné à une seule injection.



GRAPHIQUE N° 3. — Barcelonnette : 15<sup>e</sup> bataillon de chasseurs alpins. (Même légende.)

Une troisième vaccination est pratiquée en mai 1932. Aucune nouvelle atteinte n'est réapparue depuis lors.



9<sup>e</sup> RÉGIMENT DE CUIRASSIERS A LYON (graphique n° 4). — La diphtérie est endémique depuis de longues années dans la garnison de Lyon, plus particulièrement au quartier de la Part-Dieu où est logé ce régiment. Ce caractère endémique s'est plus nettement manifesté depuis décembre 1928.

Le 9<sup>e</sup> cuirassiers a subi depuis cette époque trois poussées épidémiques qui se sont greffées sur le fond d'endémicité.

De décembre 1928 jusqu'en août 1929, 45 cas se sont produits.

De juillet à septembre 1929, 20 cas.

De novembre 1929 à mars 1930, 58 cas.

Cette dernière poussée épidémique, qui avait été assez marquée pendant les mois d'hiver, était en décroissance manifeste ; mais il y avait tout lieu de redouter une recrudescence au moment de l'arrivée des jeunes soldats ; ces craintes étaient d'ailleurs justifiées, car 6 cas apparaissaient chez eux peu après l'incorporation. Dans la première décade de mai, avant que la vaccination eût pu subir un début d'exécution.

*Vaccination.* — 117 hommes reçoivent les trois injections les 16 mai, 3 et 18 juin 1930, de plus 17 rhino-vaccinations sont pratiquées chez les sujets porteurs de contre-indications d'ordre médical.

*Résultats.* — Dans les jours qui suivirent, 2 cas de diphtérie éclatèrent, les 20 et 21 mai, après la première injection ; un troisième apparut le 3 juin, après la deuxième injection (ce troisième cas n'avait subi que la rhino-vaccination).

Depuis lors, aucune nouvelle atteinte ne se déclara jusqu'en octobre 1930. L'amélioration s'est ainsi montrée telle que la vaccination du contingent d'octobre ne fut pas jugée nécessaire.

Cependant, en novembre, plusieurs cas firent éclosion.

Le 14 novembre, 1 cas chez un ancien soldat, non vacciné.

Le 15 novembre, 2 cas chez de jeunes soldats incorporés en octobre, non vaccinés.

Le 24 décembre, 1 cas chez un ancien soldat non vacciné.

En janvier et février 1931, 4 cas chez de jeunes soldats arrivés en octobre 1930. Rappelons que ce contingent n'avait pas subi la vaccination.

Toutefois, la survenance des 4 atteintes de janvier et février 1931, chez de jeunes soldats arrivés en octobre, fit supposer que le contingent devant être incorporé en avril 1931 pouvait payer le tribut habituel.

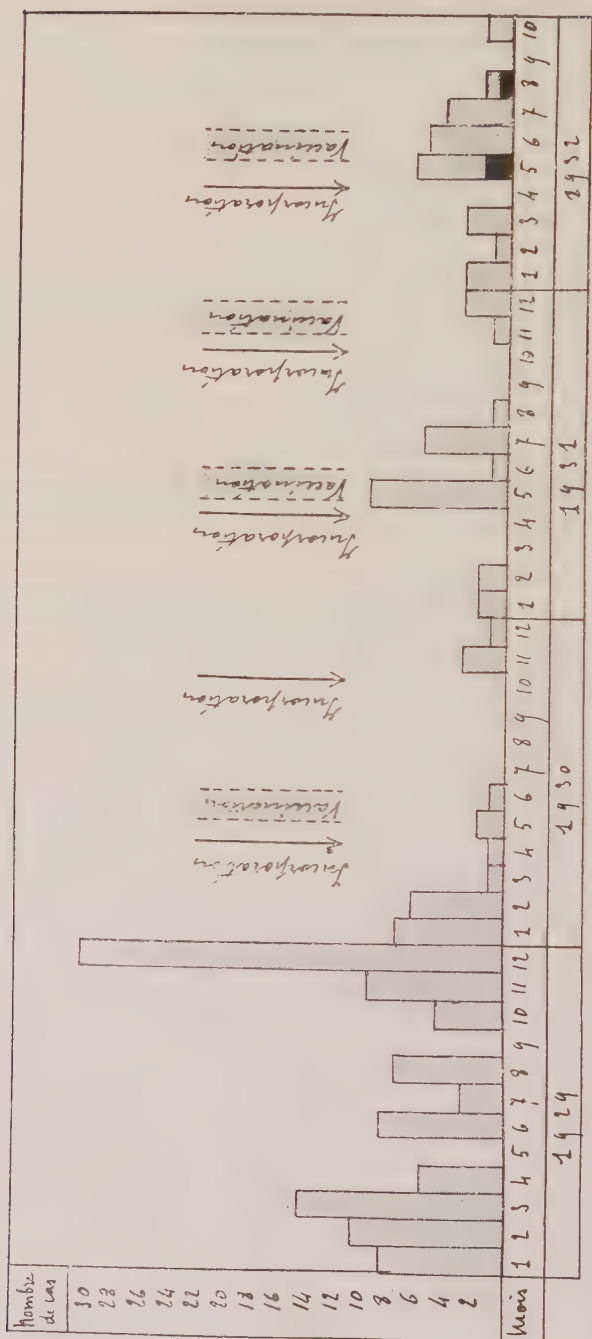
Une nouvelle vaccination fut dès lors appliquée en mai 1931. Elle ne fut pas inutile, car l'incorporation des jeunes soldats fut marquée par une poussée nouvelle qui se traduisit de la façon suivante :

Un jeune soldat fut atteint dans les premiers jours de mai avant que la réaction de Schick ne fût pratiquée. Dans les semaines qui suivirent, 9 cas éclataient, toujours chez les recrues, dont 7 n'avaient reçu qu'une injection ; puis 7 en juillet chez d'anciens soldats arrivés en octobre et non vaccinés ; enfin, 1 cas au début d'août (non vacciné) ; au total : 18 cas.

En août 1931, par conséquent, l'endémie paraissait enrayée ; mais, instruit par l'expérience, et par crainte d'un retour offensif lors de l'incorporation d'octobre suivant dans ce régiment qui se trouvait caserné dans un quartier très peuplé où la diphtérie sévit en permanence, on décide de vacciner le contingent arrivé à cette époque.

Une troisième vaccination est donc pratiquée en novembre 1931 (les 7 et 25 novembre et le 14 décembre).

*Résultat :* Peu de temps après la vaccination, on observa 2 cas chez des vaccinés après la deuxième injection, puis 2 autres, l'un deux jours, l'autre

GRAPHIQUE N° 4. — Lyon : 9<sup>e</sup> régiment de cuirassiers. (Même légende.)

quatre jours après la troisième; depuis lors (18 décembre), on ne compta plus que 7 nouvelles atteintes, uniquement développées chez des hommes non vaccinés: 3 engagés volontaires, 2 sujets dont la réaction de Schick avait été négative, 1 autre qui n'était pas présent au corps lors des opérations de vaccination; depuis mars, aucun cas nouveau n'a plus été signalé.

Mais l'incorporation de fin avril approchait; la fin des manifestations diphtériques était de date trop récente pour qu'on pût se croire à l'abri d'une reprise.

Une quatrième vaccination est donc prescrite pour l'arrivée des recrues. Elle est pratiquée les 21 mai, les 19 et 25 juin 1932; 4 apparaissent du 20 au 24 mai chez des jeunes soldats, par conséquent, avant le début de la vaccination.

Du 24 au 27 mai, 3 cas surviennent chez 2 anciens vaccinés complètement en novembre 1931, puis chez une recrue non vaccinée en raison d'une contre-indication d'ordre médical.

En juin, 6 nouvelles atteintes, dont 1 chez un vacciné à deux injections, 2 chez des hommes n'ayant encore reçu qu'une injection, et 3 chez des non-vaccinés. En juillet, 5 cas, puis 2 en août, dont 1 chez un vacciné. Enfin, 2 en octobre chez des non-vaccinés.

2<sup>e</sup> RÉGIMENT DE ZOUAVES A OUDJDA (graphique n° 5). — Ce régiment était aux prises avec la diphtérie depuis dix longues années. Celle-ci persistait à la faveur des apports nombreux provenant du Maroc occidental, de l'Algérie et de la France dus aux passages incessants dans cette garnison d'un nombre important d'isolés et de détachements. Malgré les mesures prophylactiques qui avaient été prises, la diphtérie s'accroissait pour atteindre son maximum en 1926; elle déclinait dans la suite, mais en fournissant toujours un chiffre important d'atteintes.

En 1926, on comptait 147 cas.

En 1927, on comptait 110 cas.

En 1928, on comptait 64 cas.

En 1929, on comptait 112 cas.

En 1930, on comptait déjà 10 cas de janvier en mai.

Il n'était pas douteux que la diphtérie trouverait dans les jeunes soldats, qui allaient être incorporés en avril, un aliment nouveau à son extension. La vaccination associée s'imposait donc.

Vaccination: 199 hommes furent soumis à la vaccination associée, les 12 et 30 mai et le 16 juin 1930.

En raison de la nécessité de renforcer la vaccination antitypho-paratyphérique dans une région réputée très typhoigène, les trois injections comportèrent le mélange des deux vaccins aux doses suivantes:

Première injection — 1 cent. cube de TAB + 1/2 cent. cube d'anatoxine.

Deuxième injection — 1 cent. cube de TAB + 1 cent. cube d'anatoxine.

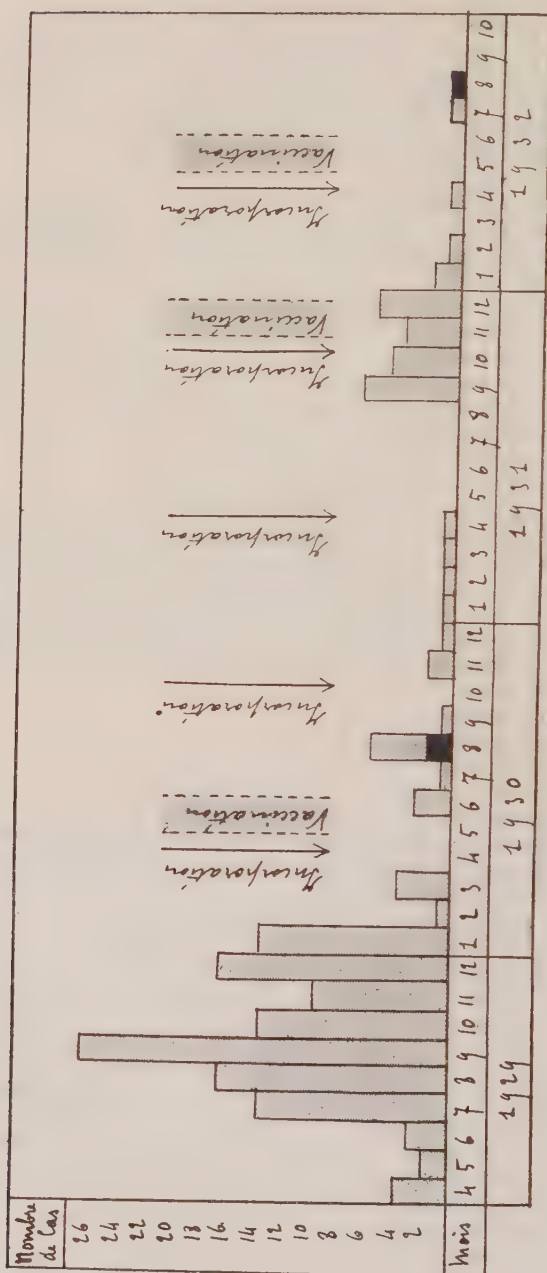
Troisième injection — 1 cent. cube de TAB + 1 c. c. 1/2 d'anatoxine.

Résultats: De mai 1930 jusqu'à février 1931, on constata encore un certain nombre d'atteintes diphtériques; 3 se produisirent en juin, 1 en juillet, 6 en août, 1 en septembre, 2 en novembre et 3 en décembre; soit un total de 16 parmi lesquelles on compte:

12 chez des hommes non vaccinés, dont 2 anciens soldats (la plupart présentèrent des formes moyennes; 2 formes graves).

2 chez des sujets incomplètement vaccinés, survenues les 12 et 13 juin, alors qu'ils venaient de recevoir la deuxième injection (formes bénignes):





2 les 15 et 16 août chez des vaccinés par trois injections (ces derniers présentèrent des formes très bénignes) et 4 le même mois chez des non-vaccinés, enfin 1 en septembre.

Bref, la morbidité était réduite à ce point, que l'on différa la vaccination lors de l'incorporation d'octobre 1930.

Les cas qui survinrent dans la suite furent rares et isolés : 2 cas en novembre, 1 en décembre, puis 1 lors de chacun des mois suivants chez des incorporés d'octobre, non vaccinés.

En avril 1931, nouvelle arrivée de recrues que l'on ne vaccina pas en raison du faible degré d'endémie qui avait régné durant les mois précédents.

D'avril à septembre, aucune atteinte nouvelle, mais en septembre 7 cas éclatèrent et 5 en octobre.

Devant cette reprise, *une nouvelle vaccination* s'imposait pour l'incorporation d'octobre. Elle fut pratiquée le 14 novembre, puis les 4 et 19 décembre.

Le résultat obtenu fut le suivant :

2 cas apparaissent en novembre 1931 chez des non-vaccinés du contingent de mai précédent, et 2 autres chez des recrues *avant la vaccination* ; puis 6 en décembre, dont 4 chez des non-vaccinés, et 2 qui n'avaient reçu que deux injections ; enfin, 2 en janvier et 1 en février chez des non-vaccinés.

Malgré l'atténuation considérable qui s'était produite sous l'influence heureuse de cette mesure, *une nouvelle vaccination* fut prescrite pour l'incorporation d'avril 1932.

Depuis lors, 2 cas seulement se sont produits, l'un en juillet 1932, l'autre en août chez un jeune soldat vacciné à trois injections.

6<sup>e</sup> RÉGIMENT DE DRAGONS A VINCENNES (graphique n° 20). — Depuis plusieurs années, ce régiment était le siège d'une endémie tenace qui contrastait avec l'intégrité presque complète des unités voisines appartenant à la même garnison ; la diphtérie sévit d'ailleurs en permanence dans la population civile qui constitue pour cette troupe un aliment habituel aux contaminations qu'on y observe ; et chaque arrivée de recrues est marquée par une recrudescence dont les jeunes soldats font en grande partie les frais.

*Vaccination* : La vaccination associée est pratiquée pour la première fois en mai 1931, peu après l'incorporation. Les trois injections ont lieu les 12 mai, 1<sup>er</sup> et 16 juin.

Dans les premiers jours de juin 10 cas apparaissent, atteignant 4 jeunes soldats et 6 anciens ; aucun n'avait subi la vaccination.

*Résultats* : Dans la suite, on n'observa plus que 3 nouvelles atteintes ; l'une frappait un ancien soldat le 24 juillet, une recrue le 8 août, un ancien le 15 octobre. Aucun d'eux n'avait été vacciné.

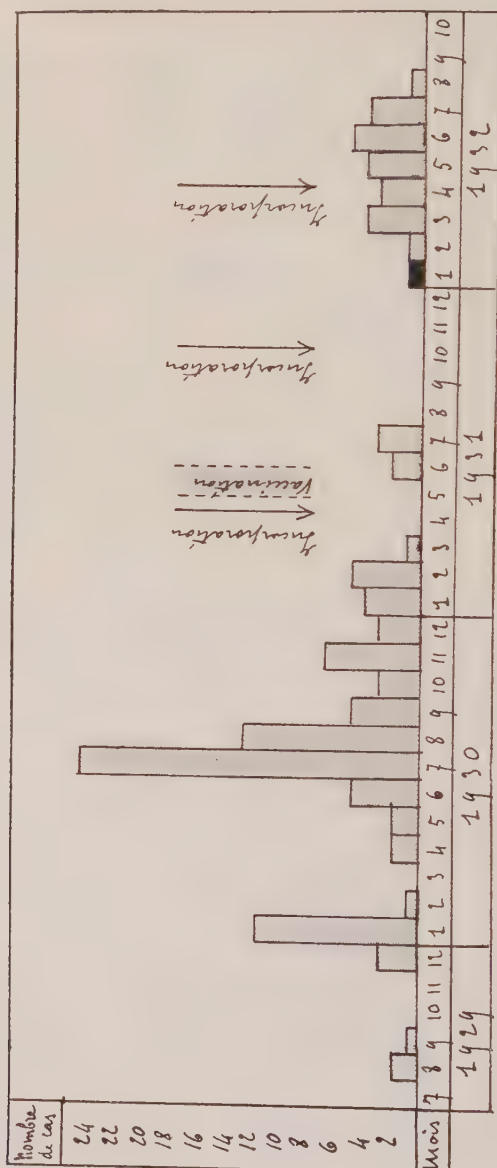
Les jeunes soldats qui avaient été vaccinés en mai 1931 restèrent indemnes jusqu'à la libération de leur classe en avril 1932.

L'endémie, bien que très atténuée, ne pouvait être considérée comme éteinte. Aussi, *une deuxième vaccination* fut-elle prescrite pour le contingent d'octobre.

A titre d'essai, elle fut pratiquée à l'aide de *deux injections* seulement que pouvait autoriser l'emploi d'une anatoxine de qualité antigène plus élevée. (Voir page 496.)

1<sup>er</sup> RÉGIMENT DE CHASSEURS A CHEVAL A ALENÇON (graphique n° 6). — L'endémie diphtérique sévissait depuis plusieurs années ; mais le dernier trimestre de

1930 avait été marqué par une poussée épidémique qui faisait redouter une recrudescence pour l'incorporation d'avril 1931.





et 3 autres du 6 au 10 juillet, chez des anciens également, tous non vaccinés.

Depuis, la diphtérie s'est montrée silencieuse à tel point que de nouvelles vaccinations ne furent plus jugées nécessaires.

En janvier 1932, cependant, 1 cas se produisit chez un sujet qui avait reçu huit mois auparavant la troisième injection au complet; il fut sans doute le point de départ d'une série de nouvelles atteintes qui frappèrent uniquement tout d'abord des sujets du contingent d'octobre précédent qui n'avaient pas été soumis à la vaccination : 8 cas apparaissent ainsi jusqu'en fin avril.

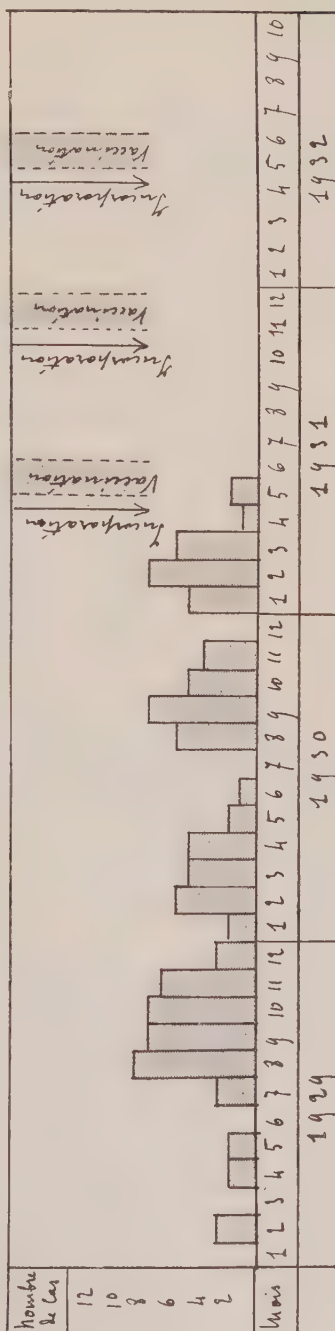
En raison d'un retard apporté à la connaissance de cette recrudescence, la vaccination du contingent incorporé en avril 1932 n'est pas pratiquée; aussi, les jeunes soldats paient-ils leur tribut dès leur arrivée : 4 cas en mai, 5 en juin, 4 en juillet, 1 en août.

Devant cette reprise de la diphtérie, due assurément à l'abandon de la vaccination, cette dernière a été prescrite pour les recrues devant arriver au corps en octobre 1932.

10<sup>e</sup> RÉGIMENT DE DRAGONS A MONTAUBAN (graphique n° 7). — La garnison de Montauban était réputée dans le 17<sup>e</sup> Corps d'Armée pour l'endémie diphtérique qui y régnait depuis plusieurs années et résistait aux mesures prophylactiques classiques :

La vaccination des jeunes soldats, mise en œuvre dès l'arrivée de ces derniers en avril 1931, eut pour résultat de faire rapidement cesser la morbidité diphtérique, puisque celle-ci ne se traduisit plus que par 2 atteintes écloses en mai suivant chez 2 anciens soldats qui n'avaient pas subi la vaccination.

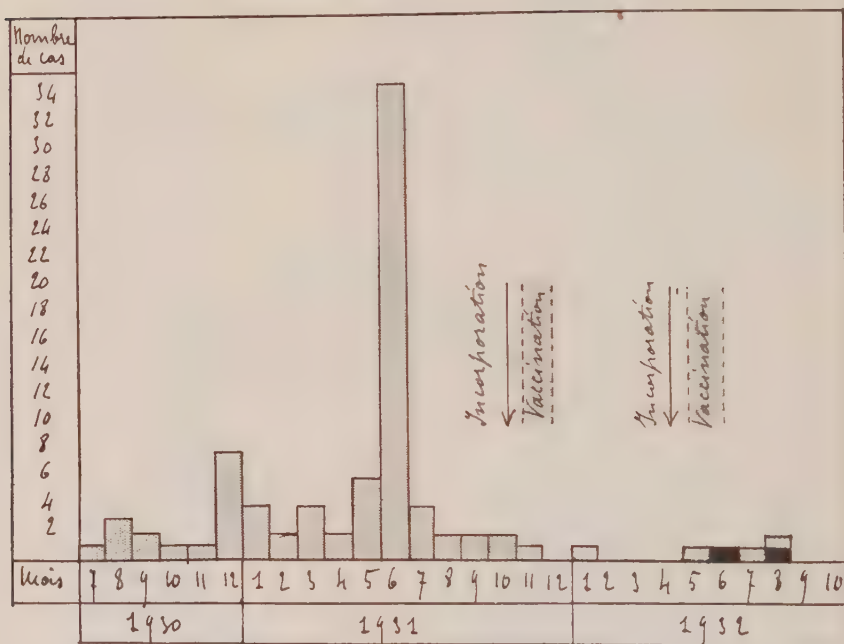
Depuis lors, par mesure de précaution, dictée par la connaissance des retours offensifs observés quand



la vaccination était suspendue, chaque nouveau contingent fut vacciné dès son incorporation.

Résultat : La diphtérie a complètement disparu des rangs de ce régiment.

1<sup>er</sup> RÉGIMENT DE HUSSARDS A ANGERS (graphique n° 8). — Ce régiment, rentré de Mayence, avait subi pendant tout son séjour en Rhénanie de multiples atteintes diphtériques. Il rentre en France en juillet, où, jusqu'en fin décembre, on compte 16 cas. Une morbidité analogue continue à se manifester dans les



GRAPHIQUE N° 8. — Angers : 1<sup>er</sup> régiment de hussards. (Même légende.)

premiers mois de 1931, et sur l'endémie permanente bien établie depuis plusieurs années se greffa une explosion soudaine qui se chiffra par 35 atteintes pour le seul mois de juin, s'abaissant, il est vrai, à 4 en juillet pour tomber à 2 cas mensuels jusqu'en octobre. Au total, 63 cas depuis le début de l'année. Devant une situation aussi alarmante, on décide de soumettre à la vaccination associée les incorporés d'octobre 1931.

La vaccination a lieu les 4 et 22 novembre, et le 6 décembre 1931.

Résultats : Le 15 novembre, apparaît 1 cas chez un sujet qui n'avait reçu que la première injection ; un 2<sup>e</sup> se déclara le 23 janvier chez un jeune soldat qui, bien que Schick positif, n'avait pu être vacciné en raison d'une hospitalisation pour une toute autre affection.

Depuis lors, silence complet jusqu'en mai 1932, où un cavalier contracte la diphtérie six mois après la vaccination complète dont il avait été l'objet en novembre précédent ; en juin, 1 nouveau cas chez un jeune soldat n'ayant

reçu que deux injections lors de la dernière vaccination ; un autre apparaît en juin chez un non-vacciné, enfin 2 en août, dont 1 avait reçu les trois injections en mai dernier.

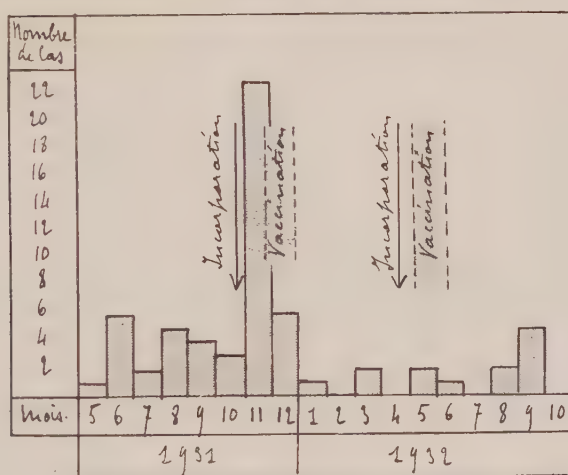
12<sup>e</sup> RÉGIMENT D'ARTILLERIE A HAGUENAU. — Même endémie que dans les régiments précédents, avec un accroissement assez marqué durant l'année 1931.

Les trois injections de vaccin mixte sont pratiquées les 13 et 30 novembre, et le 16 décembre 1931. De plus, 9 hommes qui avaient déjà reçu du TAB reçoivent trois injections d'anatoxine seule.

Résultats : Le 23 novembre : 1 cas de diphtérie chez un jeune soldat dont le Schick avait été trouvé négatif :

Un 2<sup>e</sup> cas n'apparaît que plus tard, le 17 mars 1932, chez un jeune soldat qui n'avait pas reçu de vaccin en raison d'un Schick négatif.

Une nouvelle vaccination est prescrite pour le contingent d'avril 1932 : 2 cas



GRAPHIQUE N° 9. — Lyon : 75<sup>e</sup> régiment d'artillerie. (Même légende.)

apparaissent en mai et 2 en juin, chez des non-vaccinés ; ce furent les derniers jusqu'en octobre.

75<sup>e</sup> RÉGIMENT D'ARTILLERIE A LYON (graphique n° 9). — Ce régiment était depuis plusieurs mois aux prises avec la diphtérie ; depuis juillet 1931, 13 cas s'étaient échelonnés au sein de cette troupe ; le dernier cas apparu remontait au 8 octobre.

Le nouveau contingent devait être incorporé le 20 du même mois ; il devait, par conséquent, arriver dans un milieu où l'infection, bien que disparue cliniquement, persistait certainement à l'état latent et constituait, malgré une accalmie trompeuse, une menace pour les jeunes soldats ; il a donc été jugé indispensable de vacciner ces derniers.

Ces craintes étaient légitimes, car à peine avaient-ils pris contact avec la caserne qu'un premier cas de diphtérie se présentait, le 7 novembre, suivi de 5 autres le 10, et les jours suivants de 13 autres ; au total, et jusqu'au



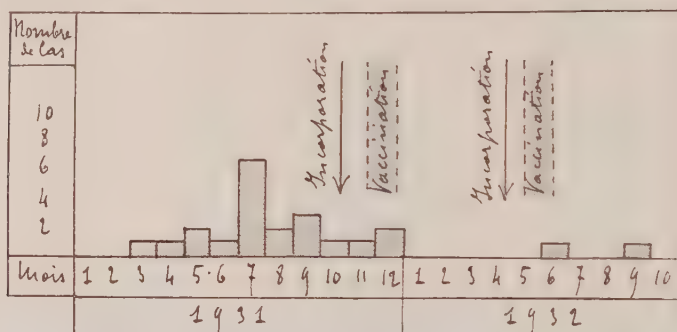
20 novembre, on compta ainsi 19 atteintes dont 16 parmi les jeunes soldats, 2 chez les anciens et 1 chez un sous-officier.

Entre temps, au milieu de cette bouffée explosive qui frappait en majeure partie les recrues d'un même bâtiment surpeuplé, la réaction de Schick était pratiquée, donnant 44 p. 100 de cas positifs.

La première injection de vaccin fut effectuée le 20 novembre, la deuxième le 8 décembre, la troisième le 23 décembre.

Depuis le 20 novembre, l'épidémie faisait mine de continuer, puisque les 23, 26 et 27 novembre, 4 nouveaux cas se déclaraient (1 ancien soldat, 2 jeunes soldats non vaccinés et 1 jeune soldat ayant reçu la première injection).

Après la deuxième injection (8 décembre), l'épidémie continue à évoluer, mais uniquement chez les soldats du contingent antérieur non vacciné et chez de jeunes soldats qui, pour des motifs divers, n'avaient reçu aucune injection préventive. Bref, jusqu'au 16 mars, 9 nouvelles atteintes diphté-



GRAPHIQUE N° 10. — Lyon : 54<sup>e</sup> régiment d'artillerie. (Même légende.)

riques furent encore constatées chez des hommes des deux contingents, mais épargnant complètement ceux qui avaient reçu la vaccination préventive.

Dans la crainte que l'infection diphtérique, bien que très atténuée, n'ait pas complètement désarmé, une nouvelle vaccination est appliquée lors de l'incorporation d'avril 1932. 2 cas apparaissent en mai : 1 chez un non-vacciné et 1 chez un homme qui, ayant contracté la diphtérie en novembre 1931, après n'avoir reçu qu'une injection, est parti en convalescence, puis est rentré au corps le 23 janvier 1932; cette récurrence est un bel exemple de la difficulté de l'immunisation chez certains sujets.

En juin, un nouveau cas; 2 en août et 5 en septembre, évoluant tous chez des non-vaccinés (2 anciens et 3 jeunes soldats).

AU 54<sup>e</sup> RÉGIMENT D'ARTILLERIE A LYON (graphique n° 10) on observait chaque année un certain nombre d'atteintes diphtériques. Sur cet état endémique, se greffa vers juin 1931 une poussée qui se traduisit en fin juillet par l'éclosion de 7 cas; poussée éphémère, certes, mais qui laissa après elle une série d'atteintes isolées dont le total s'éleva à 14 jusqu'au 20 octobre.

En vue de préserver les recrues à incorporer quelques jours après, la vac-

cination fut appliquée; les 3 injections furent pratiquées le 20 novembre, le 8 et le 22 décembre 1931.

3 atteintes se produisirent pendant la période des vaccinations, chez 3 sujets non vaccinés, le 24 novembre, chez un ancien soldat, le 2 décembre chez une recrue (non vaccinée) et le 3 chez un ancien soldat.

Depuis lors, aucun cas ne fut plus observé jusqu'à l'incorporation d'avril 1932.

Malgré cette détente manifeste, ce contingent est soumis à une *nouvelle vaccination* qui débute en mai : 2 cas seulement apparaissent depuis cette époque en juin et septembre chez d'anciens soldats non vaccinés.

LE 99<sup>e</sup> RÉGIMENT D'INFANTERIE A LYON est encore un foyer habituel d'endémie diphtérique; en novembre et décembre 1930, 32 cas faisaient éclosion parmi les incorporés d'octobre précédent.

Une *première vaccination* est pratiquée en mai 1931. Sous son influence, la diphtérie s'arrête et ne donne plus qu'un cas, en août suivant, chez un ancien soldat non vacciné.

Par mesure de précaution, on applique à nouveau la méthode (*deuxième vaccination*) aux recrues d'octobre 1931 : 2 cas seulement se produisent chez de jeunes soldats non vaccinés.

Enfin, on vaccine encore (*troisième vaccination*) le contingent arrivé en fin avril 1932. Elle ne fut commencée que le 20 mai, pour se terminer le 15 juin. La mesure était nécessaire, car 2 atteintes apparaissaient les 9 et 12 mai : 2 recrues dès leur arrivée, *avant que la réaction de Schick ne fût recherchée*.

En juin, 3 nouveaux cas chez 2 jeunes soldats qui n'avaient encore reçu qu'une injection, pratiquée le 21 mai et chez un ancien non vacciné.

En juillet, 3 cas dont un chez un vacciné à trois injections en mai dernier; depuis, un seul apparaît en octobre chez une jeune soldat non vacciné.

AU 5<sup>e</sup> RÉGIMENT DE DRAGONS PORTÉS A LYON, l'endémie était peu importante, mais en raison du voisinage de son casernement avec celui du précédent, on prescrit la vaccination.

Une *première vaccination* a lieu en mai 1931; un seul cas se produit en août suivant chez un ancien soldat non vacciné.

Toujours pour la même raison, une *deuxième vaccination* est appliquée en octobre 1931 : 1 cas éclate chez un jeune soldat après la première injection.

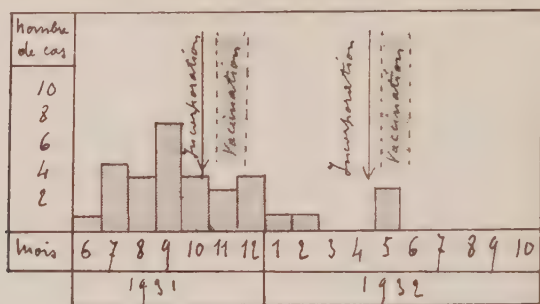
Une *troisième vaccination* est néanmoins jugée nécessaire pour les recrues d'avril 1932 : le 3 mai apparaissait une atteinte chez un nouvel incorporé, avant la vaccination.

Depuis lors, on n'enregistre qu'un deuxième cas survenu le 6 juillet chez un cavalier qui avait dû être hospitalisé après la première injection pour une affection étrangère.

LE 11<sup>e</sup> BATAILLON DE CHASSEURS ALPINS A GAP (graphique n° 11), jouissait, au regard de la diphtérie, d'un assez bon état sanitaire jusqu'en 1931. Durant les derniers mois de cette année, l'endémie devint plus importante (22 cas), à tel point que la *vaccination* est décidée pour l'incorporation d'octobre 1931.

7 atteintes seulement apparurent dans la suite, uniquement chez des non-vaccinés; le dernier fit son éclosion le 23 février.

Néanmoins, par crainte des contacts infectants avec la population civile où règne l'endémie, on vaccine (*deuxième vaccination*) les recrues d'avril 1932.

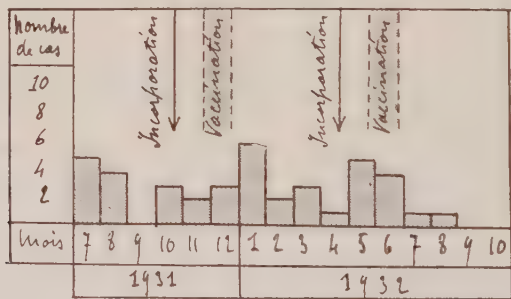


GRAPHIQUE N° 11. — Gap : 11<sup>e</sup> bataillon de chasseurs alpins. (Même légende.)

3 cas apparurent dès les premiers jours de leur arrivée, les 2, 4 et 11 mai, avant le début de la vaccination. Depuis lors, aucune atteinte ne fut plus constatée.

LE 159<sup>e</sup> RÉGIMENT D'INFANTERIE A BRIANÇON (graphique n° 12). — La diphtérie régnait depuis de longues années dans cette garnison: sur l'endémie qui y sévissait en permanence s'étaient greffées de temps à autre des explosions épidémiques d'importance variable.

Une première vaccination est décidée pour l'incorporation d'octobre 1931. La mesure était d'autant plus nécessaire que, dès leur arrivée, les jeunes



GRAPHIQUE n° 12. — Briançon : 159<sup>e</sup> régiment d'infanterie. (Même légende.)

soldats commencèrent à payer leur tribut; sur 5 cas déclarés entre le 25 octobre et le 10 novembre, 4 atteignaient, avant toute vaccination, des recrues nouvellement incorporées.

Les trois injections furent pratiquées le 20 novembre et les 10 et 24 décembre 1931. Depuis cette époque jusqu'à l'incorporation suivante une série de cas se sont produits :

En décembre, 2 cas survenaient chez 2 jeunes soldats dont l'un n'avait pas été vacciné et l'autre n'avait reçu encore que deux injections.



En janvier, 6 nouveaux cas, uniquement chez des incorporés d'octobre, non vaccinés pour des raisons diverses.

En février, 2 cas seulement (non vaccinés).

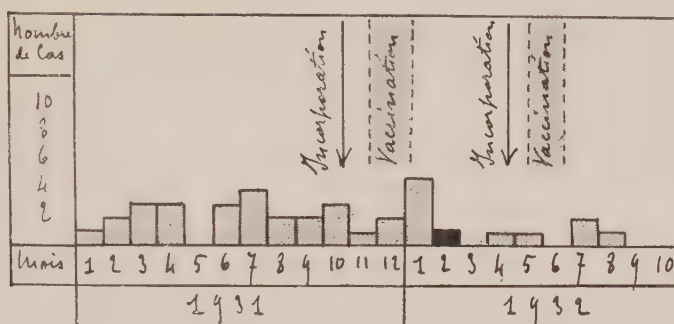
En mars, 3 cas, dont l'un n'avait reçu que deux injections; les 2 autres n'avaient pas été vaccinés.

En avril, 1 cas (vacciné à deux injections seulement).

La diphtérie continuait donc à régner jusqu'à la veille de l'incorporation d'avril 1932. Une *deuxième vaccination* s'imposait donc à l'occasion de cette dernière. Elle est pratiquée le 21 mai ainsi que les 10 et 25 juin 1932.

Elle n'était pas inutile puisque déjà, du 4 au 18 mai, la diphtérie frappait 4 jeunes soldats qui payèrent leur tribut *avant d'avoir reçu la première injection*, montrant ainsi, outre l'extrême sensibilité des organismes neufs à l'action pathogène du virus diphtérique, l'état d'infection dont le régiment était le siège.

3 atteintes se déclaraient dans la suite, toujours chez les nouveaux



GRAPHIQUE N° 13. — Grenoble : 4<sup>e</sup> régiment du génie. (Même légende.)

arrivés, après la première injection; puis 2 autres en juin et 1 en juillet et 1 en août chez des non-vaccinés appartenant au contingent d'octobre 1931.

4<sup>e</sup> RÉGIMENT DU GÉNIE A GRENOBLE (graphique n° 13). — Cette unité souffrait depuis plusieurs années d'une endémie diphtérique moyenne qui cependant, depuis le début de 1931, s'était nettement accentuée, fournissant mensuellement un chiffre d'atteintes qui ne manquait pas d'être inquiétant pour l'incorporation d'octobre 1931.

Aussi la *vaccination associée* fut-elle prescrite pour cette époque; elle débuta le 20 novembre pour se terminer vers le 8 janvier 1932.

En novembre, 1 cas se déclarait le 8 novembre avant la vaccination, puis 2 en décembre chez un ancien soldat et chez un jeune qui venait de recevoir la deuxième injection.

En janvier 1932, 5 cas firent éclosion dont 4 chez des non-vaccinés et 1 après la deuxième injection.

En février, 1 cas chez un jeune soldat qui avait subi, un mois auparavant la vaccination complète.

Enfin, au début d'avril, 1 cas chez un jeune soldat non vacciné.

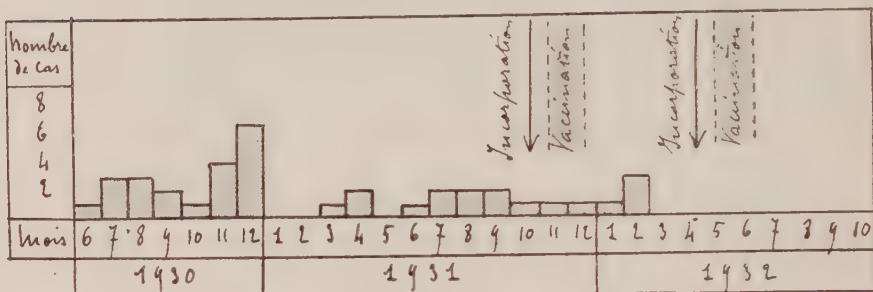
Malgré la réduction de l'endémie, on pratique une *nouvelle vaccination* sur le contingent d'avril 1932 les 7 et 27 mai et 11 juin.

Le 3 mai apparaissait 1 cas avant toute vaccination.

Enfin, 2 cas survenaient en juillet, l'un chez un homme qui avait présenté une contre-indication (albumine), l'autre chez un sous-officier non vacciné; 1 seul cas se produisit en août chez un ancien soldat non vacciné.

93<sup>e</sup> RÉGIMENT D'ARTILLERIE DE MONTAGNE, GRENOBLE (graphique n° 14). — Faible endémie, mais tenace, pendant les années 1930-1931. Pour en préserver les recrues d'octobre 1931, on prescrit la vaccination.

Résultats : 1 cas au début de novembre avant la vaccination; un autre en



GRAPHIQUE N° 14. — Grenoble : 93<sup>e</sup> régiment d'artillerie de montagne (Même légende.)

décembre chez un ancien soldat non vacciné; 1 en janvier 1932 (jeune soldat non vacciné); 3 en février, dont 2 chez un ancien, et un chez un jeune soldat, tous trois non vaccinés.

Silence ultérieur total jusqu'à l'incorporation d'avril 1932. A cette époque, nouvelle vaccination du contingent. Aucune nouvelle atteinte ne s'est produite dans la suite.

2<sup>e</sup> RÉGIMENT D'ARTILLERIE A GRENOBLE (graphique n° 15). — Endémie permanente en 1930 et 1931, révélée seulement par 1 à 4 cas mensuels. Néanmoins,



GRAPHIQUE N° 15. — Grenoble : 2<sup>e</sup> régiment d'artillerie. (Même légende.)

par crainte d'une poussée nouvelle lors de l'arrivée des jeunes soldats, la vaccination des recrues, incorporées en fin octobre 1931, est décidée et exécutée :

Avant la vaccination ou pendant son décours, 2 cas se produisirent chez de jeunes recrues entre le 6 novembre et le 10 décembre, et 1 chez un ancien (non vacciné).

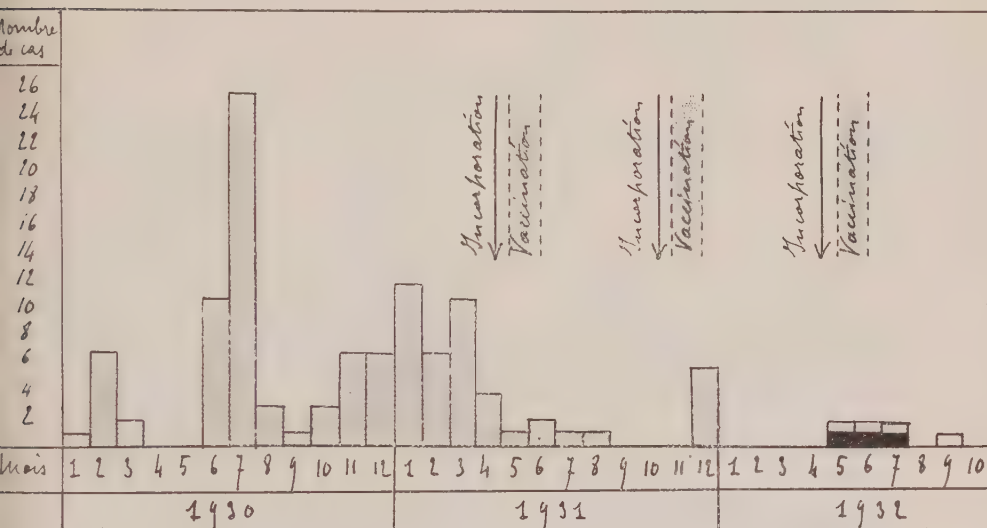
En janvier 1932, 5 nouveaux cas chez des non-vaccinés (3 jeunes soldats et 2 anciens).

Depuis cette époque, aucune atteinte jusqu'à l'incorporation suivante :

*Nouvelle vaccination* en avril 1932, en raison de la persistance de l'endémie dans la garnison; elle a lieu les 6 et 26 mai et le 10 juin.

Un cas apparaît le 11 mai chez une recrue qui venait de recevoir la première injection; un autre en août chez un ancien soldat qui avait été vacciné complètement en octobre 1931.

LE 13<sup>e</sup> RÉGIMENT DE DRAGONS A MELUN (graphique n° 16) avait, pendant



GRAPHIQUE N° 16. — Melun : 13<sup>e</sup> régiment de dragons. (Même légende.)

l'année 1930 et les premiers mois de 1931, présenté un état sanitaire très déficient à l'égard de la diphtérie; en 1930, on avait compté 53 atteintes, et 44 avaient déjà fait leur éclosion avant l'arrivée des recrues de fin avril 1931.

La première vaccination est pratiquée en mai 1931 :

Résultat : 4 cas nouveaux se déclarèrent de mai à août suivant, uniquement chez des non-vaccinés.

En raison du degré d'infection antérieure qui avait motivé cette mesure et par crainte d'un retour offensif en octobre de la même année, on décide de renouveler cette opération lors de l'incorporation d'octobre 1931 (à titre d'essai, la vaccination antidiphtérique fut pratiquée, non plus en mélange avec du T. A. B. chauffé, mais avec du lipo-vaccin T. A. B.); elle eut lieu les 6 et 25 novembre et le 10 décembre.

La mesure était nécessaire, en effet, car une poussée de 6 cas se manifesta



du 1<sup>er</sup> au 24 décembre. intéressant uniquement les soldats nouvellement incorporés et récemment soumis à la vaccination; sur ces 6 cas, 2 furent atteints après la deuxième injection, et 4 peu de jours après la troisième (3 le 19 décembre, 1 le 24 décembre), exactement les neuvième et quatorzième jours qui suivirent cette dernière.

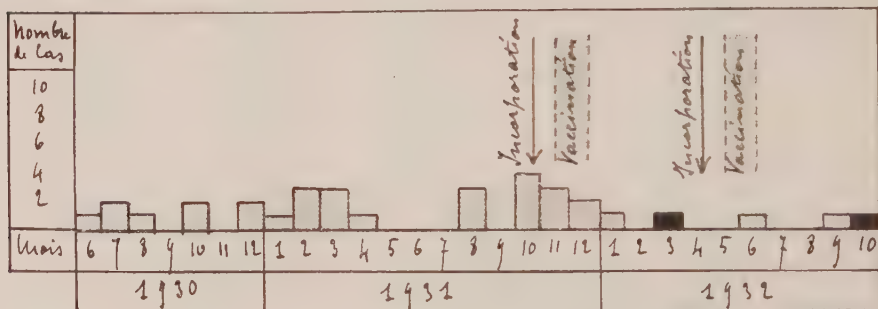
Quoi qu'il en fût, à partir du 24 décembre, aucun cas nouveau n'était plus déclaré.

L'endémie paraissait enrayée; néanmoins, par mesure de prudence, on décide de pratiquer, pour l'arrivée des recrues de fin avril 1932, une *troisième vaccination* (cette fois l'anatoxine est injectée en mélange avec du T. A. B. chauffé). Elle a lieu les 13 mai, 3 et 17 juin.

Le 8 mai, 1 cas survenait chez un vacciné qui avait reçu trois injections en novembre 1931.

Le 18 mai, une atteinte chez un cavalier qui, cinq jours auparavant, avait reçu la première injection.

En juin, 2 cas, l'un chez un ancien soldat vacciné complètement en



GRAPHIQUE N° 17. — Constantine : 3<sup>e</sup> régiment de zouaves. (Même légende.)

novembre précédent, l'autre chez une recrue non vaccinée. Il en fut de même en juillet; 1 cas en septembre chez un jeune soldat non vacciné.

3<sup>e</sup> RÉGIMENT DE ZOUAVES A CONSTANTINE (graphique n° 17). — Une endémie d'intensité moyenne, mais persistante, sévissait dans ce régiment depuis plusieurs années.

Une *première vaccination* a lieu pour les recrues du contingent d'octobre 1931, les 19 novembre, 4 et 15 décembre.

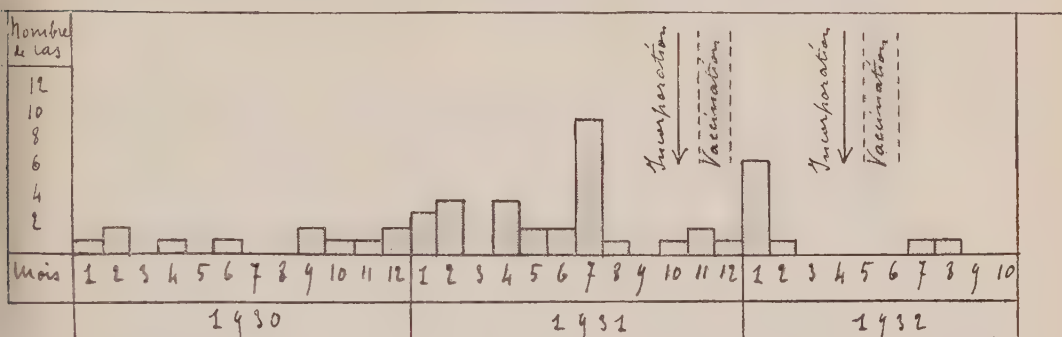
Une fois la vaccination terminée, le régiment ne compte plus que 2 cas jusqu'à l'incorporation suivante, l'un le 25 janvier 1932 chez un homme qui n'avait reçu que deux injections, en raison d'une hospitalisation intercurrente, l'autre le 10 mars chez un sujet vacciné complètement, mais irrégulièrement (les trois injections avaient été pratiquées les 16 novembre, 18 décembre et 9 janvier 1932).

Une *deuxième vaccination* est appliquée au contingent d'avril 1932. Depuis cette époque, 3 cas seulement furent constatés : l'un le 24 juin chez un homme n'ayant reçu que deux injections, un autre en septembre chez un non-vacciné, et un en octobre chez un vacciné du contingent d'avril 1932.

3<sup>e</sup> RÉGIMENT DE CHASSEURS D'AFRIQUE A CONSTANTINE (graphique n° 18). — Endémie de même caractère que dans le régiment précédent, à cette différence près que, en juillet 1931, un petit foyer de 10 cas s'était produit.

La vaccination du contingent d'octobre s'imposait. Elle fut pratiquée les 16 novembre, 5 et 19 décembre 1931. Au cours de cette vaccination, 3 cas apparurent chez des non-vaccinés.

Depuis lors, après une nouvelle « flambée » de 7 atteintes survenues en janvier 1932, chez des cavaliers non vaccinés, anciens et jeunes soldats, une



GRAPHIQUE N° 18. — Constantine : 3<sup>e</sup> régiment de chasseurs d'Afrique. (Même légende.)

détente nette s'est accusée, car un seul cas apparaissait en février, chez un jeune soldat non vacciné; ultérieurement, silence complet.

Une deuxième vaccination est cependant prescrite pour le contingent d'avril; 2 cas seulement sont apparus dans la suite, l'un en juillet, l'autre en août, chez d'anciens soldats non vaccinés.

Enfin, la vaccination associée a été appliquée encore, en avril 1932, pour la première fois à treize nouveaux régiments. Les résultats se sont montrés analogues à ceux qui viennent d'être décrits, mais ils sont encore de date trop récente pour qu'il soit possible de juger dès maintenant de la répercussion survenue sur l'évolution de l'endémie; l'observation montre cependant que l'action bienfaisante de la vaccination s'est exercée, comme dans les faits précédents, par ceux qui l'ont subie.

## II. — Enseignements à tirer de ces observations.

Les faits qui viennent d'être exposés se sont déroulés suivant des modes assez divers pour permettre de juger de la

valeur de la vaccination associée au double point de vue de son pouvoir immunisant et de son pouvoir prophylactique.

#### POUVOIR IMMUNISANT.

Il doit être envisagé au titre de l'immunité conférée non seulement contre la diphtérie, mais aussi contre les états typhoïdes.

**ÉTATS TYPHOÏDES.** — En ce qui concerne les états typhoïdes, la question sera jugée rapidement : la vaccination associée s'est montrée aussi efficace que si le T. A. B. avait été utilisé seul, à l'exclusion de l'anatoxine : depuis le début des essais jusqu'en juillet dernier, aucune atteinte n'était apparue chez les hommes qui y avaient été soumis, même pas à Oudjda où cependant le régiment qui y tient garnison évolue dans un milieu réputé pour être très typhoïgène.

En juillet 1932, cependant, une explosion de fièvre paratyphoïde B est apparue, malgré la vaccination au TAB, dans un régiment de Grenoble : mais elle a frappé, à parties égales, les sujets qui avaient été soumis uniquement à l'action du T. A. B. et ceux qui avaient subi la vaccination mixte.

Ainsi donc se trouve confirmée par la pratique l'opinion formulée par Ramon et Zoeller, d'après lesquels les deux vaccins peuvent être employés simultanément et en mélange, sans que leur pouvoir immunisant respectif ait à souffrir de cette conjugaison. Mais si la présence du vaccin T. A. B. est même susceptible de renforcer l'action de l'anatoxine, il ne semble pas, d'après les faits constatés à Grenoble, que la réciproque soit vraie.

**DIPHTÉRIE.** — Une notion domine toutes les autres : le pouvoir immunisant du vaccin mixte est indiscutable.

Dans tous les corps de troupe où il a été employé dans les conditions décrites, et une fois révolu le délai nécessaire aux opérations de vaccination et à l'établissement de l'immunité, la diphtérie n'est apparue, en règle générale, que chez les non-vaccinés ; elle ne s'est manifestée que rarement chez les vaccinés.

Certes, comme il est de règle, le bacille de Lœffler a bien provoqué quelques atteintes avant que l'immunité ait pu entrer en jeu, plus particulièrement après la première et la deuxième injection. Mais une fois que la vaccination a été complète et qu'a été dépassée la période habituellement indispensable à l'installation de la résistance cherchée, les diphtéries constatées et vérifiées bactériologiquement se sont montrées très clairsemées.

Voici d'ailleurs, figurant sur le tableau ci-après (page 478), le relevé intégral des cas observés chez les vaccinés complètement et incomplètement :

Au total, le bilan des atteintes diphtériques observées chez les sujets appartenant aux 81 contingents de jeunes soldats qui ont subi, depuis avril 1930, la vaccination associée se présente de la façon suivante :

Sur 15.126 vaccinés régulièrement, 27 ont contracté la diphtérie ; sur ce dernier chiffre, il convient d'en défalquer 7 qui ont été atteints de deux à quinze jours après la troisième injection, à une époque par conséquent où l'immunité n'est généralement pas encore complètement acquise. Il en reste donc 20 chez lesquels la diphtérie a fait son éclosion de un à huit mois après la vaccination, soit 1,32 p. 1.000. Or, le total des diphtéries observées durant la même période et dans les mêmes régiments, parmi les non-vaccinés (anciens soldats et recrues non soumises à la vaccination) et les vaccinés incomplètement (une ou deux injections), s'élève à 443 pour un effectif global de 42.000 hommes ; soit 10,54 p. 1.000.

Ces chiffres comparatifs sont éloquentes ; ils plaident hautement en faveur de la méthode.

Assurément tous les vaccinés n'ont pas bénéficié de ses bienfaits, car un petit nombre d'entre eux ont contracté la diphtérie. On opposera peut-être l'existence de ce déchet, si minime soit-il, aux résultats obtenus après contrôle par la réaction de Schick : Ramon et Zoeller en effet, L. Martin, Loiseau et Laffaille ont relevé une proportion de 100 p. 100 de réactions négatives, et Meerseman (1) un taux très approchant (99,7 p. 100) parmi les vaccinés du 9<sup>e</sup> Cuirassiers à Lyon. Mais l'état d'immunité n'est

(1) MEERSEMAN. *Archives de Médecine et de Pharmacie militaires*, janvier 1932, p. 84.



Nombre d'atteintes diphtériques survenues chez les vaccinés.

RÉGIMENT	VACCINÉS INCOMPLÈTEMENT				VACCINÉS COMPLÈTEMENT		
	Après 1 injection	Délai d'apparition	Après 2 injections	Délai d'apparition	Après 3 injections	Délai d'apparition	Cas à retenir
Pontoise, 5 <sup>e</sup> cuirassiers. . . . .					1	7 mois.	1
Ecole préparatoire de Rambouillet . . . . .	1	5	2	5 jours.	1	9 jours.	
Melun, 13 <sup>e</sup> dragons . . . . .				13 jours.	3	14 jours.	
					1	5 mois.	1
					1	6 mois.	1
					1	2 mois.	1
Vincennes, 6 <sup>e</sup> dragons . . . . .	1	8			1	8 mois.	1
Alençon, 1 <sup>er</sup> chasseurs à cheval . . . . .	9	de 4 à 16	4	de 3 à 10 jours.	1	2 jours.	
Lyon, 9 <sup>e</sup> cuirassiers . . . . .					1	4 jours.	
					2	5 mois.	2
					1	6 mois.	1
					1	6 mois.	1
Lyon, 99 <sup>e</sup> d'infanterie. . . . .	5	de 14 à 17	1	14 jours.			
Lyon, 5 <sup>e</sup> dragons portés . . . . .	2	de 10 à 14					
Lyon, 75 <sup>e</sup> régiment d'artillerie de campagne. . . . .	1	6					
Lyon, 14 <sup>e</sup> section d'infirmiers militaires . . . . .	1	14					
Barcelonnette, 15 <sup>e</sup> bataillon de chasseurs alpins . . . . .	1	3					
Albertville, 7 <sup>e</sup> bataillon de chasseurs alpins. . . . .							
Modane, 99 <sup>e</sup> régiment d'infanterie. . . . .	3	de 4 à 16	1	10 jours.	1	5 mois.	1
Briançon, 159 <sup>e</sup> régiment d'infanterie . . . . .	3	11		11 jours.			
				2 mois 1/2.			
				3 mois 1/2.			
				16 jours.			
				30 jours.			
Grenoble, 4 <sup>e</sup> génie . . . . .				11 jours.	1	5 semaines.	1
Grenoble, 2 <sup>e</sup> régiment d'artillerie. . . . .	1	5					
Angers, 1 <sup>er</sup> hussards . . . . .	1	11	1	14 jours.	1	8 mois.	1
					1	5 mois.	1
					1	2 mois.	1
Strasbourg, 3 <sup>e</sup> hussards . . . . .	5	de 10 à 14	4	de 8 à 14 jours.	3	3 mois.	3
Oudjda, 2 <sup>e</sup> zouaves . . . . .			1	4 mois.			
Alger, 9 <sup>e</sup> zouaves . . . . .	1	1	1	3 jours.	1	2 mois.	1
Constantine, 3 <sup>e</sup> zouaves. . . . .			1	10 jours.	1	2 mois.	1
Bastia, 3 <sup>e</sup> zouaves . . . . .			1	52 jours.	1	5 semaines.	1
Total. . . . .	36		22		27		20

peut-être pas toujours immuable; il n'est pas impossible qu'il fléchisse sous l'influence des causes anergisantes multiples auxquelles les soldats sont exposés. Si l'immunité est acquise difficilement, et n'est obtenue qu'à sa limite minima, au-dessous de laquelle la réceptivité se substitue à l'état réfractaire, un fléchissement de ce dernier peut permettre à un contact infectant de déterminer l'éclosion de la diphtérie.

D'ailleurs, ainsi que l'ont déjà montré les recherches poursuivies à l'occasion de la vaccination par la seule anatoxine, tous les hommes ne sont pas égaux devant l'action immunisante du vaccin. S'il en est qui acquièrent l'immunité après une seule injection (peut-être les sujets allergiques suivant la conception de Zoeller), certains ne l'obtiennent que péniblement et d'une façon précaire après trois injections; il est même parfois nécessaire d'en pratiquer une quatrième pour obtenir le résultat cherché (L. Martin, Loiseau et Laffaille, Poullain, etc.).

Quoi qu'il en soit, les rares déficiences qui ont été constatées ne peuvent empêcher de faire admettre le *pouvoir hautement immunisant de la vaccination associée*; l'atténuation considérable de la morbidité diphtérique chez les vaccinés, contrastant avec la persistance de l'infection chez les non-vaccinés, en apporte une preuve particulièrement démonstrative; elle confirme dans l'ensemble les notions acquises antérieurement à la faveur du contrôle de l'immunité par des réactions d'ordre biologique.

Enfin il est à noter que les diphtéries survenues chez les vaccinés ont revêtu un *caractère de bénignité* qui s'oppose à la sévérité, voire même à la gravité de certaines atteintes présentées par ceux qui n'ont pas reçu les injections vaccinales.

Cette bénignité est même parfois telle qu'on est en droit de se demander si l'on ne se trouve pas en face d'angines banales développées chez de simples porteurs de germes. L'observation de certaines atteintes de cet ordre révèle en effet l'existence d'une gorge rouge sans fausses membranes, recouverte ou non d'un enduit pultacé ou d'une sécrétion purulente dont l'aspect diffère essentiellement d'une production pseudo-membraneuse. Il y aurait assurément grand intérêt à déterminer en pareils cas si la réaction angineuse ressortit ou non à l'action

pathogène du bacille de Lœffler. Plusieurs auteurs ont déjà posé la question; celle-ci n'a pu encore recevoir de réponse.

#### POUVOIR PROPHYLACTIQUE.

Une autre notion se dégage également de l'étude entreprise; c'est le pouvoir d'arrêt dont est douée la vaccination sur les manifestations épidémiques et endémiques de la diphtérie.

Qu'il s'agisse d'*épidémies* nettement constituées ou de simples *poussées épidémiques* d'intensité variable, greffées sur un état endémique préexistant, la méthode se montre d'une efficacité incontestable. Les faits qui se sont déroulés notamment à Melun (graphique n° 16), à Montauban (graphique n° 7), à Oudjda, en septembre 1931 (graphique n° 5), à Albertville (graphique n° 2) où une explosion d'atteintes consécutives à l'incorporation d'octobre 1930 a été rapidement enrayée, en apportent le témoignage. Il en est de même, et d'une façon plus saisissante encore, de l'épidémie qui s'est déclarée brusquement au 75<sup>e</sup> Régiment d'artillerie à Lyon (graphique n° 9) chez les recrues, quelques jours après leur arrivée au corps, avant même que la vaccination n'ait été commencée. Dès que cette dernière a été appliquée, l'infection s'est arrêtée chez les vaccinés; un seul a été frappé, qui n'avait reçu qu'une injection; par contre, elle a continué à atteindre ceux qui ne l'avaient pas été. On ne peut fournir une preuve plus démonstrative de l'efficacité de la méthode.

Ce pouvoir prophylactique s'est encore exercé sur les *manifestations endémiques*. En effet, en ramenant le plus souvent à néant le nombre des atteintes chez les vaccinés, la méthode utilisée a entraîné par là même une réduction importante de l'infection régnante. Sous son influence, chaque fois qu'elle a été entreprise, la poussée dont les jeunes soldats font habituellement les frais aussitôt après leur incorporation n'a pas tardé à céder; quant à l'endémie qui persistait chez les anciens non soumis à la vaccination, elle est entrée en régression, parfois d'une façon brusque, mais demandant souvent un temps plus ou moins long pour décliner avant l'incorporation du contingent suivant.

L'expérience montre en effet qu'il existe des degrés dans l'action inhibitrice de la vaccination vis-à-vis de l'endémie :

PARFOIS L'ENDÉMIE RÉGNANTE CÈDE RAPIDEMENT. — En certains cas cette action d'arrêt est vraiment remarquable; très peu de temps après qu'elle a été appliquée aux nouveaux incorporés, la diphtérie rétrocede et ne donne plus que de rares atteintes; les unes surviennent au cours des opérations de vaccination, puis quelques autres plus espacées durant les semaines qui suivent, si bien qu'après un délai assez court, variable suivant les cas, l'endémie paraît éteinte.

C'est ce qui s'est passé à Pontoise au 5<sup>e</sup> Cuirassiers (graphique n° 1), alors qu'avant l'exécution de cette mesure la diphtérie avait résisté à tous les moyens prophylactiques courants; à part les 4 cas apparus en novembre 1930, on n'a plus compté, jusqu'en mai 1932, que 5 cas échelonnés tous les quatre à cinq mois.

Un épisode particulièrement intéressant est celui du 10<sup>e</sup> Dragons à Montauban (graphique n° 7), qui avait subi peu de temps auparavant une poussée assez sévère de diphtérie. Après vaccination des recrues en avril 1931, 2 cas seulement sont apparus; depuis lors, silence complet dans les mois qui suivirent.

Des constatations analogues ont été faites à Alençon (graphique n° 6), à Alger, au 3<sup>e</sup> Chasseurs d'Afrique à Constantine (graphique n° 18), etc.

Ce qui peut paraître le plus surprenant dans ces faits, c'est la disparition de l'infection non seulement chez les vaccinés, mais aussi chez bon nombre d'anciens soldats qui se trouvent sous les drapeaux en même temps que les premiers, et qui cependant n'ont pas été immunisés. Coïncidence heureuse, dira-t-on. Cette coïncidence serait bien étrange puisqu'elle se serait produite à la fois dans plusieurs unités, qui, avant la vaccination, étaient aux prises depuis des mois, voire même des années, avec une endémie persistante.

D'ailleurs le fait que les anciens soldats ont été épargnés dans les épisodes précédents n'est pas spécial à ces derniers; on l'a observé en effet dans un certain nombre d'autres régiments (9<sup>e</sup> Cuirassiers, 2<sup>e</sup> Zouaves, 15<sup>e</sup> Bataillon de Chasseurs



alpins, etc.), où l'endémie, tout en s'atténuant, s'est éteinte moins rapidement.

Cette particularité semble pouvoir recevoir l'explication suivante : tout d'abord les anciens, qui ont vécu pendant six mois déjà dans un milieu d'endémie, ont certainement, à la faveur de contacts bactériens, acquis un certain degré d'immunité ; mais quand, à la faveur de l'incorporation suivante, les jeunes soldats commencent, dès leur arrivée ou peu après, à payer leur tribut habituel, cette immunité peut fléchir sous l'influence des sommations microbiennes déterminées par l'éclosion plus ou moins dense des atteintes présentées par les recrues. C'est ainsi qu'en temps ordinaire les anciens soldats présentent assez souvent quelques atteintes diphtériques, qui se glissent au milieu des autres ; mais on a l'impression que, chez eux, sans ces apports nouveaux dont la survenance brusque est susceptible d'avoir raison de leur résistance, la diphtérie se rarifierait davantage et finirait par s'éteindre comme spontanément.

On en arrive dès lors à supposer que, dans les faits précités, en tarissant la source de contaminations nouvelle pour les anciens soldats, la vaccination du jeune contingent a permis, chez ces derniers, le libre développement d'un état réfractaire qui ne demandait qu'à s'installer ; n'étant plus gênée par les surinfections auxquelles ils étaient fatalement exposés, et dégagée des entraves qu'elles opposaient à sa libre production, l'immunité a pu continuer son œuvre d'assainissement naturel et entraîner l'extinction de la diphtérie dans leurs rangs.

RETOURS OFFENSIFS DE L'ENDÉMIE. — Il faut bien reconnaître cependant que, parmi tous les régiments où la vaccination a été appliquée, peu nombreux sont ceux où elle a été couronnée de succès aussi rapides. Il a fallu sans doute, pour que ce résultat soit acquis, l'intervention simultanée de plusieurs facteurs adjuvants qui ont contribué à favoriser son action stérilisante : faible degré de l'endémie, peut-être aussi sa localisation exclusive à l'élément militaire qui a été soustrait à des contaminations de provenance extérieure, etc.

La plupart du temps, en effet, cette rétrocession de la diphtérie *n'est pas définitive*. L'expérience acquise démontre que, même dans les cas où elle a paru complètement jugulée par la seule

vaccination des recrues, l'endémie est sujette à des retours offensifs qui prennent naissance à plus ou moins longue échéance.

Plusieurs exemples en apportent le témoignage :

Ainsi, à Pontoise (graphique n° 1), la vaccination des jeunes soldats avait été pratiquée en novembre 1930; depuis lors, l'atténuation de l'endémie (quelques rares atteintes clairsemées) qui en était résultée s'était maintenue à tel point qu'il n'avait pas été jugé nécessaire de vacciner les contingents ultérieurs. Cependant, la diphtérie réapparaissait en juin et juillet 1932 sous la forme de 7 atteintes dont l'éclosion devait imposer une nouvelle vaccination lors de l'incorporation d'octobre suivant.

Il en a été de même à Alençon (graphique n° 6) où les recrues du 1<sup>er</sup> Chasseurs à cheval furent vaccinées en mai 1931; on n'avait plus enregistré dans la suite que 5 cas, dont 2 en juin et 3 en juillet; à partir de janvier 1932 on assiste alors à une poussée nouvelle qui se traduit tout d'abord par des atteintes paraissant devoir rester sans lendemain, mais depuis mars une série de nouveaux cas font leur éclosion, dessinant nettement une reprise de l'endémie.

C'est encore ce qui s'est produit d'une façon plus précoce à Barcelonnette, à Lyon, au 9<sup>e</sup> Cuirassiers, à Oudjda (voir les graphiques correspondants n°s 3, 4 et 5).

Il est vraisemblable qu'en certains de ces cas les reprises constatées ont été provoquées par des importations provenant des rapports plus ou moins étroits avec la population civile; mais la plupart se sont produites à l'occasion de l'arrivée de contingents nouveaux qui, avant d'avoir pu être vaccinés ou bénéficier de l'immunité, se sont infectés à la faveur du premier contact avec un milieu dont l'endémie avait pu sembler complètement éteinte; mais celle-ci était entretenue sans fracas par quelques atteintes restées éparses dans le temps, comme aussi parfois, d'une façon inapparente, par de simples porteurs de germes qui, vestiges de l'endémie clinique antérieure, avaient continué à transmettre l'infection silencieusement et à l'insu de tous.

A vrai dire, on devait s'attendre à ces réveils, et prévoir que, dans les garnisons où règne l'endémie urbaine, ils ne manqueraient pas de se produire, au moins après la libération des

contingents vaccinés, chez les nouveaux incorporés qui ne l'étaient pas.

En tout cas, on peut remarquer que, chaque fois qu'après avoir subi une interruption la vaccination a été reprise pour lutter contre un retour de l'endémie, celle-ci n'a pas tardé à décliner pour disparaître ultérieurement (voir Barcelonnette et Oudjda); de tels faits témoignent une fois de plus de l'action d'arrêt indiscutable que la vaccination exerce sur l'évolution des manifestations endémiques de la diphtérie.

MOYENS D'Y REMÉDIER. — En faisant saisir la raison de la persistance de l'endémie et de ses offensives nouvelles malgré la vaccination des jeunes soldats, de semblables observations étaient de nature à dicter la conduite à tenir en vue de les éviter.

A vrai dire, les mesures à prendre dans ce but pouvaient se résumer simplement dans la vaccination d'emblée de tout l'effectif à préserver (anciens et jeunes soldats); mais une telle pratique n'est pas toujours réalisable, surtout quand les troupes sont soumises au régime du service à court terme; déjà les anciens soldats ont subi, dès leur incorporation, la vaccination au T.A.B. seul; s'il faut, dans la suite, en pleine période d'instruction, pratiquer la réaction de Schick, la lire, faire les trois injections d'anatoxine, et assurer après chacune d'elles une indisponibilité de vingt-quatre à quarante-huit heures, l'instruction est fatalement appelée à en souffrir; à moins de nécessité absolue, il convient de se montrer assez réservé à cet égard. Au demeurant, si les circonstances permettent d'attendre, le problème semble pouvoir être résolu en vaccinant, au fur et à mesure de leur incorporation, tous les contingents appelés successivement à servir dans les unités où règne l'endémie. A défaut de la vaccination totale et simultanée de tout le corps de troupe, ce procédé est apparu, *a priori*, comme le seul qui fût capable de rendre réfractaire tout son effectif, les uns étant naturellement immunisés (Schick négatif), les autres le devenant artificiellement (vaccination).

EFFETS DES VACCINATIONS APPLIQUÉES SUCCESSIVEMENT A CHAQUE CONTINGENT. — La réalisation de ce programme a été poursuivie

dans un certain nombre de corps de troupe. Il reste à juger de l'efficacité de cette mesure.

Elle a été ainsi appliquée au 7<sup>e</sup> Bataillon de Chasseurs à Albertville (graphique n° 2); une première vaccination (octobre 1930) avait diminué considérablement la morbidité; à partir de février, elle était en effet réduite à néant; la vaccination des recrues d'avril 1931 lutte efficacement contre la poussée qu'on attendait à l'arrivée des jeunes soldats; 3 cas seulement se produisent encore; nouvelle vaccination en novembre de la même année; la diphtérie ne donne que 8 cas jusqu'à l'incorporation suivante; à cette époque (mai 1932), nouvelle vaccination qui entraîne la disparition totale de l'infection.

Des résultats du même ordre ont été obtenus plus rapidement encore au 11<sup>e</sup> Chasseurs à Gap (graphique n° 11), au 1<sup>er</sup> Hussards à Angers (graphique n° 9), au 93<sup>e</sup> d'Artillerie et au 2<sup>e</sup> R. A. D. à Grenoble (graphiques n°s 14 et 15), au 54<sup>e</sup> Régiment d'Artillerie à Lyon (graphique n° 10), au 9<sup>e</sup> Zouaves à Alger; il a suffi de 2 ou 3 vaccinations des contingents successifs pour amener l'extinction complète (ou presque) de l'endémie.

Il en fut de même à Constantine, au 3<sup>e</sup> Chasseurs d'Afrique (graphique n° 18) et au 3<sup>e</sup> Zouaves (graphique n° 17).

L'exemple du 10<sup>e</sup> Dragons (graphique n° 7) est particulièrement probant. Ce régiment était depuis plusieurs années le siège d'une endémie assez sévère; une première vaccination (jeunes soldats seulement), en mai 1931, entraîne, comme il a été dit plus haut, une extinction totale de la diphtérie durant les mois suivants. Instruit par l'expérience des retours offensifs qui se sont produits en plusieurs unités où la vaccination n'avait pas été renouvelée, on prescrit la vaccination du contingent d'octobre 1931 : aucun cas; puis de celui d'avril 1932 : aucun cas. Il ne peut être apporté de preuve plus démonstrative de l'efficacité de ces interventions appliquées systématiquement aux contingents successivement appelés.

Dans ces unités, par conséquent, la morbidité diphtérique, déjà très atténuée après la première vaccination, est restée nulle après la seconde, ou bien elle ne s'est traduite que par l'apparition de quelques rares cas chez des recrues dont la diphtérie est survenue avant qu'ils aient pu acquérir l'immunité.



En d'autres régiments, par contre, l'endémie a opposé une plus grande résistance; elle a semblé s'éteindre peu de temps après chaque vaccination; mais elle est réapparue régulièrement après chaque nouvelle incorporation. C'est ce qui s'est produit notamment au 9<sup>e</sup> Cuirassiers (Lyon) et au 2<sup>e</sup> Zouaves (Oudjda). Les graphiques intercalés dans ce travail traduisent mieux qu'une description l'évolution qui s'est poursuivie.

Par conséquent, si bienfaisante qu'elle paraisse dans la plupart des cas, l'efficacité de la méthode est sujette à certaines variations: il n'est pas douteux qu'elle se heurte parfois à des difficultés qu'il y a lieu de bien mettre en évidence :

CAUSES DE LA PERSISTANCE DE L'ENDÉMIE MALGRÉ L'APPLICATION DES VACCINATIONS SUCCESSIVES. — Comme il a été dit, l'idéal consiste à rendre réfractaires tous les hommes qui ne le sont pas; aussi, l'extinction complète souhaitée de l'endémie ne peut être réalisée que si *tous les réceptifs* ont subi la vaccination. Or, dans la pratique, il en est toujours un certain nombre qui échappent à cette dernière et restent par conséquent exposés à une contamination éventuelle.

Parmi eux figurent tout d'abord les hommes chez lesquels l'examen médical préalable a découvert une *contre-indication*, et la rhino-vaccination qui peut leur être appliquée n'est pas douée de la même efficacité que la vaccination par voie sous-cutanée. D'autres arrivent au corps en dehors des périodes de vaccination; ce sont des engagés volontaires ou des hommes qui, à la suite d'une mutation, viennent de garnisons où, en l'absence d'endémie, la vaccination antidiphtérique n'a pas été pratiquée; un effort doit évidemment être tenté en ce sens, et de tels sujets devront à l'avenir, quelle que soit l'époque de leur arrivée, être soumis à la vaccination associée, ou, s'ils ont reçu du T. A. B. seul, recevoir sous la peau les doses classiques d'anatoxine diphtérique.

Il faut compter encore avec des sujets qui, rendus *indisponibles* (infirmerie ou hôpital) au cours de la vaccination par une affection intercurrente, n'ont pu subir en temps voulu les trois injections.

Le déchet que l'on observe ainsi au regard de la vaccination

varie suivant les régiments, mais il existe toujours; voici quelques chiffres qui permettent d'en juger :

A Pontoise, sur 295 hommes Schick positifs, 244 reçoivent la première injection; 225 seulement ont reçu les trois. D'où un déchet de 70 hommes, soit 27,7 p. 100 des réceptifs qui ont échappé à la vaccination.

A Albertville, sur 165 réceptifs, 116 seulement sont complètement vaccinés. Donc déchet de 49 réceptifs, soit 29,7 p. 100.

A Barcelonnette, sur 76 Schick positifs, 59 reçoivent la vaccination complète, soit un déchet de 22,3 p. 100.

A Oudjda, sur 238 réceptifs, 199 sont complètement vaccinés; le déchet s'élève dès lors à 1,63 p. 100.

A Lyon (9<sup>e</sup> Cuirassiers), sur 169 réceptifs, 129 reçoivent la première injection, 123 la deuxième et 117 la troisième. D'où un déchet total de 52, soit une proportion de 30,7 p. 100.

L'importance de ces pourcentages est loin d'être négligeable. Or, ces nombreux sujets réceptifs qui n'ont pu bénéficier des bienfaits de la vaccination continuent à vivre en milieu infecté; ils restent donc exposés aux contacts microbiens qui persistent; c'est d'ailleurs parmi eux que souvent la diphtérie continue à se manifester, alors que les vaccinés y échappent; s'ils la contractent, ils contribuent à entretenir à des degrés divers l'endémie qu'une vaccination appliquée intégralement pouvait permettre d'enrayer en totalité.

L'expérience montre en outre qu'un certain nombre de sujets chez lesquels la réaction de Schick s'est montrée négative, jugés réfractaires par conséquent, peuvent contracter la diphtérie, soit que leur immunité acquise à la limite minima ait fléchi, soit que le caractère douteux de leur réaction cutanée ait rendu particulièrement délicate l'interprétation de l'épreuve de Schick; il se pourrait encore que, d'après Meerseman, Friess et Renard (1), la limite de la négativité de la réaction ne réponde pas toujours exactement au minimum d'antitoxine contenue dans le sérum, jugé suffisant pour témoigner de l'existence de l'immunité.

Mais, ce qui domine par-dessus tout, pour expliquer la réapparition régulière de la diphtérie dans certains corps

(1) MEERSEMAN, FRIESS et RENARD. *Société de Biologie de Lyon*, 19 décembre 1932.

malgré la vaccination des contingents successivement incorporés, c'est la *recrudescence* plus ou moins marquée *qui suit presque toujours l'arrivée des jeunes soldats*.

Ces reprises sont alimentées presque uniquement par des recrues qui payent leur tribut dès le premier contact avec le régiment; souvent même elles apparaissent *avant que la réaction de Schick ait été pratiquée*, en tout cas avant que la vaccination ait subi un début d'exécution.

Des faits de cet ordre ont été constatés en maintes unités, notamment au 99<sup>e</sup> d'Infanterie, au 11<sup>e</sup> Bataillon de Chasseurs, au 2<sup>e</sup> Zouaves, au 9<sup>e</sup> Cuirassiers et au 159<sup>e</sup> d'Infanterie où l'endémie s'est montrée sévère; il se sont renouvelés à plusieurs reprises dans un même régiment au fur et à mesure des incorporations successives.

Chez d'autres, la diphtérie apparaît également alors qu'ils sont en cours de vaccination, soit après la première, soit après la deuxième injection, alors qu'ils n'ont pas encore acquis l'immunité.

Par conséquent, entre le jour de l'arrivée des jeunes soldats et le moment où ils sont immunisés, il existe une sorte de *période « creuse »*, qui permet à la diphtérie d'évoluer parmi eux d'abord sans la moindre entrave et, dans la suite, sans autre barrière que la protection toute relative conférée par les premières injections vaccinales. Cette période de transition est même d'assez longue durée: il faut compter, tout d'abord, une semaine pour la réaction de Schick et sa lecture; vient ensuite un délai de cinq semaines pour que la vaccination soit complète; à ces chiffres, il convient d'ajouter trois à quatre semaines pour laisser à l'immunité le temps de s'installer définitivement; au total, neuf à dix longues semaines pendant lesquelles tout individu réceptif est exposé à subir les méfaits de l'infection.

Cette période critique est, assurément, à la base du réveil que l'on observe en certaines unités après chaque nouvelle incorporation, alors que l'évolution très ralentie de la diphtérie obtenue après la vaccination du contingent précédent pouvait en faire escompter la terminaison. Jointe à l'existence du reliquat important des réceptifs qui ont échappé à l'immunisation antérieure, elle contribue pour une bonne part, et à la faveur de la reprise qu'elle favorise, à assurer l'entretien de l'endémie;

que celle-ci se traduise par l'éclosion de quelques atteintes cliniques ou, d'une façon occulte, par la chaîne ininterrompue des porteurs de germes, sa persistance est de nature à entraver, en certains cas, la réalisation intégrale du but poursuivi.

A vrai dire, tous ces obstacles sont susceptibles de se présenter dans tous les régiments traités par la vaccination des contingents successifs. Cependant ceux-ci ne se comportent pas tous de la même façon vis-à-vis de cette pratique : chez les uns, la diphtérie cède facilement après une nouvelle tentative; en d'autres, celle-ci doit être renouvelée lors des incorporations de deux ou trois contingents, et l'on a vu qu'après des vaccinations ainsi quatre fois répétées l'infection, bien que très diminuée, ne désarme pas toujours (9<sup>e</sup> Cuirassiers, Lyon). Il existe donc entre les diverses unités des différences assez marquées dont la cause semble devoir être cherchée en grande partie dans le *degré de l'endémie* qui y règne.

Si l'endémie est faible, le péril créé par la période « creuse » et par le déchet des réceptifs qui ont été soustraits à la vaccination est de minime importance, car les sujets qui n'ont pas pu acquérir l'état réfractaire sont peu exposés à la contagion; il n'en est pas de même si l'infection du milieu est profonde et s'étend à de nombreux éléments : le danger couru par les réceptifs devient d'autant plus grand; le tribut payé par les jeunes incorporés dès leur arrivée au corps, et avant la fin de cette période de « flottement », en apporte la preuve la plus formelle.

Quoi qu'il en soit, il est permis d'affirmer que dans la grande majorité des cas où elle a été mise en œuvre la méthode des vaccinations successives a permis, partout où elle a été appliquée, de lutter efficacement contre l'endémie; en certains cas, celle-ci a été complètement vaincue; en d'autres, malgré la résistance qu'elle a opposée aux efforts réalisés, elle a subi une diminution très notable que n'avait pu obtenir la mise en œuvre de la prophylaxie classique. La simple vue des graphiques reproduits met en valeur le contraste qui existe entre l'intensité de l'endémie qui a précédé l'application de la vaccination et le faible degré de l'infection qui l'a suivie. En somme, dans l'ensemble, les résultats ont été très satisfaisants; mais il con-



vient de les améliorer encore en luttant contre les difficultés signalées.

Or, il est relativement facile d'obvier aux inconvénients provenant des omissions commises lors de la pratique de la vaccination par des mesures appropriées qui peuvent permettre d'immuniser *tous* les éléments réceptifs d'un même régiment; l'exécution de prescriptions adéquates peut en avoir raison. Il est par contre impossible, dans l'état actuel des choses, de faire disparaître la période « creuse » qui suit l'arrivée des jeunes soldats, et pendant laquelle ils doivent attendre le bénéfice de la vaccination.

En vérité, jusqu'à ce que dans le milieu civil la vaccination soit appliquée assez largement pour permettre d'espérer l'arrivée à la caserne de sujets déjà immunisés, il faut se résigner, du moins dans les régiments de forte endémie, et dans les garnisons où la diphtérie sévit en permanence dans la population, à renouveler les vaccinations lors de chaque incorporation.

Telle est la formule à laquelle il faut actuellement s'arrêter pour atteindre le but poursuivi. Elle a été dictée par les circonstances spéciales à la vie militaire et notamment par le réveil pour ainsi dire régulier de l'endémie diphtérique à la faveur de l'incorporation bi-annuelle. Les tâtonnements initiaux qui ont marqué la période des essais ont été, d'ailleurs, d'un grand secours pour permettre de saisir les causes des reprises observées, alors que, non encore instruit par l'expérience, on pouvait espérer avoir d'emblée raison de la ténacité de l'infection régnante.

### III. — Essais de simplification de la vaccination antidiphtérique à l'aide d'une anatoxine renforcée.

La vaccination, qui a été mise en œuvre lors des essais qui précèdent, a été pratiquée suivant la méthode indiquée initialement par Ramon. En dehors du vaccin T.A.B, destiné à la préservation des états typhoïdes, le vaccin antidiphtérique qui lui était associé consistait dans une anatoxine titrant 10 unités anatoxiques au centimètre cube; avec les trois injections de

1/2, 1 et 1 c. c. 1/2, le total des unités injectées atteignait donc 30 unités anatoxiques.

Injecté à cette dose, le vaccin antidiphtérique permet donc, d'après les résultats acquis jusqu'alors, de conférer à un sujet réceptif l'immunité dont il est dépourvu. Mais l'expérience fournie par les résultats de la réaction de Schick et le dosage de l'antitoxine dans le sang, comme il avait été pratiqué antérieurement par L. Martin, Loiseau et Laffaille (1) avec la technique de Römer, puis Ramon et Debré (2) par un procédé dérivant de la technique fondamentale d'Ehrlich, montre qu'avec cette technique 5 à 6 p. 100 des vaccinés en moyenne restent susceptibles de contracter la diphtérie parce qu'ils ne sont pas immunisés ou le sont insuffisamment. L'étude du bilan des atteintes diphtériques observées dans l'armée après vaccination prouve, en effet, que certains sujets vaccinés complètement peuvent prendre la diphtérie au bout de plusieurs mois. Il n'est donc pas douteux que l'immunité ainsi conférée peut n'être pas toujours suffisante.

Or, différents procédés ont été proposés en vue de la renforcer. Sans vouloir ici les énumérer tous, retenons la pratique conseillée par MM. L. Martin, Loiseau et Laffaille (3), qui ont pensé résoudre le problème en effectuant une quatrième injection; ils l'ont appliquée avec succès à l'école primaire départementale de Vitry; Poulain (4) a constaté également des résultats satisfaisants à Saint-Etienne; à Berek, Debré, Ramon, M. et G. Mozer et M<sup>lle</sup> Prieur (5), après avoir vacciné 500 enfants, avaient constaté chez 25 d'entre eux une réaction positive (5 p. 100); ces derniers reçurent alors une quatrième injection; la réaction de Schick pratiquée deux mois après cette dernière était devenue négative chez 23 d'entre eux; restaient donc 2 sujets seulement qui n'avaient pu acquérir l'état réfractaire. L'injection supplémentaire a donc eu pour résultat de

(1) L. MARTIN, LOISEAU et LAFFAILLE. *Soc. méd. des Hôp. de Paris*, 16 mai 1924 et *Acad. de méd.*, 18 mars 1930.

(2) RAMON et DEBRÉ. *Acad. de méd.*, 25 février 1930 et *Ces Annales*, septembre 1930, p. 326.

(3) L. MARTIN, LOISEAU et LAFFAILLE. *Annales de l'Institut Pasteur*, septembre 1928.

(4) POULAIN. *Académie de médecine*, juillet 1932.

(5) DEBRÉ, RAMON, M. et G. MOZER et M<sup>lle</sup> PRIEUR. *Société médicale des Hôpitaux de Paris*, 26 juin 1931.

faire baisser dans des proportions importantes le nombre des réceptifs restés tels malgré la vaccination.

Toutefois, malgré l'efficacité dont il se montre capable, ce procédé ne paraît pas pouvoir être appliqué dans l'armée: les nécessités de l'instruction sous un régime de service à court terme s'y opposent. Aussi, pouvait-on être séduit par la méthode nouvelle que Ramon, Debré, M. et G. Mozer ont fait récemment connaître, à savoir l'emploi d'une anatoxine douée d'une valeur antigène intrinsèque élevée, et que l'on peut injecter en quantité supérieure à celle que l'on utilise couramment. En effet, lors des essais qu'ils ont tentés à l'aide de trois injections (1 cent. cube, 1 cent. cube et 2 cent. cubes) d'une anatoxine titrant 16 unités, soit 64 unités au total, ils ont pu assurer aux sujets ainsi vaccinés une immunité supérieure à celle qu'on a coutume d'observer; les 265 sur lesquels l'expérience a porté ont présenté une réaction de Schick négative, soit 100 p. 100; de plus la teneur de leur sérum en antitoxine s'est montrée supérieure à 1/30 d'unité antitoxique, pouvant atteindre 1/10<sup>e</sup> dans 95 p. 100 des cas, et parfois même 10 unités antitoxiques. L'immunité ainsi conférée se trouve donc généralement plus élevée qu'avec la méthode classique.

Dans une autre série d'essais poursuivis dans une colonie scolaire belge, Ramon et Nélis (1) n'ont pu pratiquer, sur 295 enfants de cinq à douze ans, chez lesquels la réaction de Schick n'avait pas été préalablement recherchée, que deux injections (1 cent. cube et 1 c. c. 5) à trois semaines d'intervalle de cette même anatoxine titrant 16 unités (soit 40 unités au total). Or, sur ces 295 enfants, 291 (soit 98,6 p. 100) ont présenté, de douze à quinze jours après la deuxième injection, un Schick négatif; de plus, chez les 4 enfants restés réceptifs, le Schick, renouvelé trois semaines après le premier, ne s'est plus montré positif que chez un seul. Par conséquent, avec deux injections la proportion de 100 p. 100 était presque atteinte.

La valeur antigène intrinsèque de l'anatoxine injectée ressort d'ailleurs de nouvelles expériences poursuivies, après réac-

(1) RAMON et NÉLIS. *Société de Biologie*, 30 mai 1931 et *Académie Royale de Belgique*, 31 octobre 1931.

tion de Schick préalable, par Ramon, Timbal et Nélis (1) qui ont comparé les qualités immunisantes de 3 échantillons d'anatoxine de valeur antigène différente, titrant respectivement 16,7 et moins de 2 unités. L'épreuve de Schick, pratiquée quinze jours après la deuxième injection, a donné les résultats suivants : alors qu'avec une anatoxine de moins de 2 unités, on ne compta que 10 p. 100 de sujets rendus réfractaires, avec l'anatoxine de 7 unités, ce chiffre s'éleva à 81 p. 100, et l'anatoxine de 16 unités assura l'immunité dans 96 p. 100 des cas.

Ainsi se trouve confirmée l'influence des doses d'anatoxine injectée sur l'accroissement de la résistance à l'infection.

Poulain (2) a d'ailleurs apporté à ces faits d'ordre biologique la consécration de l'expérience en milieu d'endémie : il a constaté à Saint-Etienne, lors des vaccinations pratiquées chez des enfants de un à six ans, que le pourcentage des atteintes diphtériques diminuait avec la quantité d'unités anatoxiques utilisées : en 1931, chez les enfants incomplètement vaccinés à l'aide de 5 à 15 unités (deux à une injection), il a compté 6 p. 1.000 d'atteintes avec une mortalité de 1,25 p. 1.000 chez ceux qui ont reçu 25 à 30 unités, ce chiffre s'est abaissé à 2,8 p. 1.000 sans aucun décès ; avec 40 à 50 unités ou 3 ou 4 injections, la morbidité fut réduite à néant.

Ces faits étaient de nature à faire envisager la possibilité d'apporter une simplification à la méthode de vaccination anti-diphtérique appliquée dans l'armée ; la réduction du nombre des injections qui en découlait pouvait, en effet, permettre d'espérer que serait levée une partie des difficultés suscitées par les exigences de l'instruction militaire ; mais il fallait savoir si les résultats d'ordre pratique, obtenus à la suite de deux injections (au lieu de trois) avec une anatoxine de titre élevé, confirmeraient les notions nouvellement acquises à la faveur des réactions biologiques précédentes.

L'occasion de tenter un essai de ce genre fut offerte par l'écllosion brusque d'un foyer épidémique dont le 152<sup>e</sup> régiment d'infanterie, à Colmar, commença à devenir le siège en décembre 1931.

(1) RAMON, TIMBAL et NÉLIS. *Société de Biologie*, 23 avril 1932.

(2) POULAIN. *Académie de Médecine*, juillet 1932.



..

Depuis plusieurs années, la garnison de Colmar était le siège d'une endémie persistante qui résistait aux moyens prophylactiques habituels employés couramment dans l'armée, et se trouvait vraisemblablement en rapport avec une endémie régnant dans la population civile.

Le 152<sup>e</sup> régiment d'infanterie n'avait, à vrai dire, présenté, annuellement, que quelques atteintes jusqu'en 1931 : mais, avant le début de 1931, commencent à éclore une série d'atteintes moins disséminées : 6 cas apparaissent au cours du premier trimestre avec 1 décès ; en avril, un seul cas ; à partir de mai (4 cas), on assiste à une poussée assez marquée, qui présente son acmé en juin et juillet (18 cas avec un décès) et continue à se manifester dans la suite avec 3 à 5 cas mensuels. Jusqu'à fin décembre, on enregistrait ainsi 52 cas, dont certains revêtirent un caractère de gravité assez accusé ; on compta d'ailleurs 4 décès, dont 3 par myocardite.

La situation devenait donc assez inquiétante, et il convenait de juguler rapidement cet état endémo-épidémique qui menaçait de s'étendre et de déterminer, au moment prévu de l'arrivée des recrues, en fin avril, une recrudescence nouvelle.

Comme les recrues avaient subi en novembre 1931 la vaccination au T. A. B. il ne pouvait plus être question de pratiquer la vaccination associée ; le seul moyen qui se présentait consistait en la vaccination à l'anatoxine seule. De plus, en vue d'arrêter net le développement de l'infection qui atteignait les deux contingents réunis à cette même époque, il fut décidé de vacciner, après réaction de Schick préalable, non seulement les incorporés du mois d'octobre précédent, mais la totalité des hommes qui se trouvaient présents. Enfin, en s'appuyant sur les résultats obtenus par Ramon et Nélis, relatés plus haut, toutes mesures furent prises pour que la vaccination ne comportât que deux injections, l'une de 1 cent. cube, l'autre de 1 c. c.  $\frac{1}{5}$ , d'une anatoxine titrant 15 unités (soit au total 37,5 unités), que Ramon mit obligeamment à ma disposition. Cette vaccination était urgente, car, pendant la première quinzaine de janvier 1932, 13 nouveaux cas s'étaient produits.

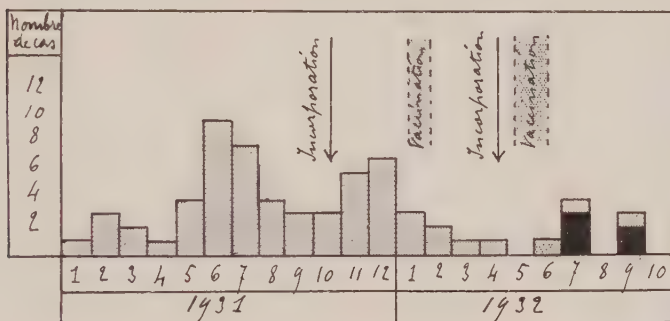
La première injection fut pratiquée du 13 au 16 janvier sur 869 hommes présentant un Schick positif; la seconde du 3 au 6 février sur 767 seulement; 57 en effet étaient absents du corps à cette date (permissions, hospitalisations, etc.) et 45 autres furent éliminés pour des motifs d'ordre médical.

Les réactions consécutives n'ont pas été plus marquées qu'à la suite des injections pratiquées avec l'anatoxine titrant 10 unités.

Quant à la suite réservée à l'évolution de la diphtérie, elle se résume dans les constatations suivantes :

De nouvelles atteintes firent leur éclosion :

- 1° Le 16 janvier, le jour même de la première injection;
- 2° Le 17 janvier, après la première injection pratiquée le 13;
- 3° Le 27 janvier, *idem*;
- 4° Le 15 février, dix jours après la deuxième injection;
- 5° Le 19 février, chez un homme qui n'avait pu recevoir qu'une injection (16 janvier) en raison d'une bronchite survenue depuis lors;
- 6° Le 22 mars, chez un homme qui n'avait pu recevoir qu'une injection



GRAPHIQUE N° 19. — Colmar : 452<sup>e</sup> régiment d'infanterie.

La vaccination pratiquée en janvier 1932, motivée par une recrudescence brusque de l'endémo-épidémie, a été effectuée, à titre d'essai, à l'aide de deux injections d'une anatoxine titrant 15 unités, à l'exclusion de T. A. B.

La vaccination prescrite à l'occasion de l'incorporation d'avril 1932 a été effectuée à l'aide de trois injections de vaccin associé, l'anatoxine utilisée titrant 10 unités.

(5 février), la deuxième ayant été différée en raison de l'éclosion intercurrente d'une furonculose;

- 7° Le 8 avril, chez un non-vacciné (Schick négatif).

Au total, sur 7 cas apparus depuis le début de la vaccination, jusqu'à l'arrivée du contingent d'avril, un seul s'est déclaré après vaccination complète, mais dix jours seulement après la deuxième injection, alors que l'immunité ne pouvait être complètement acquise.

Voilà donc une épidémie qui, après avoir résisté à tous les

moyens classiques mis en œuvre pour l'enrayer, a cédé rapidement à la pratique de la vaccination simple appliquée à la totalité des éléments réceptifs du corps de troupe infecté.

Ce résultat (graphique n° 19) n'a rien qui puisse surprendre en raison du pouvoir d'arrêt que possède la vaccination antidiphtérique en semblables circonstances; mais il y a lieu de retenir qu'il a été obtenu avec deux injections seulement de l'anatoxine titrant 13 unités; celles-ci ont donc présenté la même efficacité prophylactique immédiate que trois injections de l'anatoxine de faible teneur.

Il convient toutefois de remarquer que, dans la suite, la diphtérie a fait son apparition chez 5 sujets ayant reçu les deux injections : 3 cas en juillet et 2 en septembre, soit six et huit mois après la deuxième injection. Ces atteintes ont d'ailleurs été très bénignes; deux d'entre elles se sont révélées sous la forme d'angines pultacées, et l'on peut se demander si, pour ces dernières, on ne s'est pas trouvé en présence d'angines banales survenues chez des porteurs de germes. Quoi qu'il en soit, ce déchet (0,65 p. 100) pouvait être prévu puisque Ramon et Nélis avaient constaté par la réaction de Schick que, à la suite de deux injections comportant au total 40 unités anatoxiques, 1,4 p. 100 des enfants vaccinés étaient restés réceptifs.

\*  
\*  
\*

L'expérience acquise sur le renforcement de l'immunité antidiphtérique, lié à l'emploi des vaccinations associées, pouvait faire présager que deux injections de l'anatoxine titrant 13 unités, mélangée au vaccin antityphoïdique, permettraient d'obtenir l'état réfractaire, non plus de 98,6 p. 100 des vaccinés (Ramon et Nélis), mais de la totalité des sujets ainsi traités, soit 100 p. 100.

C'est ce qu'ont pensé Ramon et Debré; aussi, à leur instigation, me suis-je décidé à tenter un essai en ce sens. L'occasion s'est présentée de l'appliquer au 6<sup>e</sup> Régiment de Dragons (à Vincennes), où l'endémie diphtérique régnait depuis plusieurs années :

Lors de l'incorporation d'avril 1931, les recrues avaient subi la vaccination associée (T. A. B. + anatoxine diphtérique), suivant la méthode décrite anté-

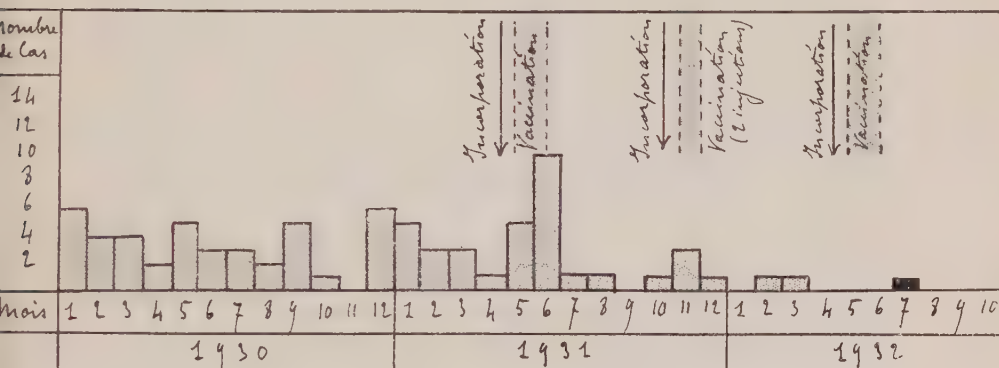
rieurement (trois injections) : depuis cette date, la diphtérie, absente chez les vaccinés, avait persisté chez ceux qui ne l'avaient pas été (13 cas). Il importait donc de préserver les jeunes soldats qui, devant être incorporés en octobre 1931, risquaient fort de contracter l'infection, puisque celle-ci n'avait pas désarmé.]

Après recherche préalable de la réaction de Schick destinée à éliminer les sujets naturellement réfractaires, deux injections mixtes de T. A. B. chauffé d'anatoxine titrant 15 unités furent pratiquées chez les réceptifs.

Première injection : 1/2 cent. cube de T. A. B. et 1 cent. cube d'anatoxine diphtérique.

Deuxième injection : 1 cent. cube de T. A. B. et 1 cent. cube d'anatoxine.

La première injection fut effectuée le 9 novembre 1931, chez 177 hommes réceptifs, et la deuxième le 1<sup>er</sup> décembre, soit vingt jours après, chez 148 seulement (les 29 autres ayant été ou hospitalisés, ou réformés, ou dirigés sur



GRAPHIQUE N° 20. — Vincennes : 6<sup>e</sup> régiment de dragons.

Lors de l'incorporation d'octobre 1931, la vaccination associée a été pratiquée à titre d'essai, à l'aide de 2 injections d'une anatoxine titrant 15 unités.

Pour l'incorporation d'avril 1932, la vaccination associée a été reprise, suivant la méthode antérieure, à l'aide de 3 injections d'anatoxine utilisée titrant 10 unités.

d'autres corps); les réactions provoquées, locales ou générales, furent minimes après la première comme après la deuxième injection.

L'évolution ultérieure de la diphtérie se présente de la façon suivante :

Le 17 novembre, 1 cas de diphtérie apparaissait chez un cavalier quelques jours après avoir reçu la première injection.

Les 18 et 20, 2 autres cas chez deux sujets qui n'avaient pas été vaccinés parce qu'ils étaient absents de leur garnison.

Le 1<sup>er</sup> janvier 1932, 1 cas se présentait chez un soldat qui avait reçu les deux injections, mais dont le début de l'angine remontait à quelques jours avant son hospitalisation; forme bénigne.

Le 16 janvier : nouveau cas chez un non-vacciné.

Il en fut de même le 23 mars chez un engagé volontaire arrivé au corps après la période de vaccination, et non vacciné.



Au total, depuis la fin de la vaccination, 6 cas se sont produits, dont 1 chez un vacciné incomplètement (une injection), 1 autre a fait son éclosion chez un vacciné à deux injections, un peu moins d'un mois après la dernière injection; les 4 autres n'avaient pas subi la vaccination. Depuis lors, la diphtérie ne s'est plus manifestée parmi eux (graphique n° 20).

Bien qu'elle n'ait comporté que deux injections, cette vaccination associée s'est donc montrée aussi active qu'avec les trois injections pratiquées jusqu'alors; la valeur antigène de l'anatoxine employée dans l'un et l'autre cas explique l'identité des résultats : sous le régime antérieur des trois injections ( $1/2$ , 1, et 1 c. c.  $1/2$ ) l'anatoxine titrait 10 unités, soit 30 unités anatoxiques; avec les deux injections (1 et 1 cent. cube d'anatoxine titrant 15 unités, le total de ces dernières s'élevait également à 30.

A vrai dire, cet essai qui a donné, au regard de la morbidité diphtérique, des résultats identiques à ceux qui ont été rapportés précédemment, ne renseignait nullement sur l'accroissement de l'immunité dont les vaccinés par la nouvelle méthode avaient pu bénéficier à la faveur de l'adjonction du vaccin T. A. B. Seule la mesure du pouvoir antitoxique de leur sérum pouvait apporter à cet égard les précisions nécessaires.

Dans ce but, un prélèvement de sang a été pratiqué sur 40 hommes vaccinés, le 7 janvier 1932, soit trente-sept jours après la dernière injection, et chez 11 autres le 26 janvier, soit cinquante-six jours après cette dernière; la mesure du taux de l'antitoxine pratiquée par Ramon sur le sérum de ces 51 sujets a donné les résultats qui suivent (1) :

Chez aucun d'entre eux, tout d'abord, le taux d'antitoxine ne s'est trouvé inférieur à  $1/30$  d'unité; par conséquent, tous (soit 100 p. 100) avaient, à l'époque précitée, acquis l'immunité.

Chez 5 p. 100 d'entre eux, le taux d'antitoxine avoisinait  $1/10$  au centimètre cube.

Chez 35 p. 100, il était compris entre  $1/10$  et 1 unité.

Chez 60 p. 100, il était supérieur à l'unité, atteignant parfois 20, 30 et même 40 unités.

(1) RAMON et DEBRÉ. *La Presse Médicale*, 20 avril 1932.

Si l'on compare ces résultats avec ceux qui découlent des essais poursuivis à Berck par Ramon, Debré, M. et G. Mozer après trois injections d'anatoxine seule, on ne peut qu'être frappé de l'avantage présenté à cet égard par la vaccination associée, même à deux injections; d'après les constatations de ces auteurs, 92,63 p. 100 des vaccinés présentaient plus de 1/10 d'unité antitoxique; chez 44,28 p. 100 de ces derniers, la teneur en antitoxine s'élevait à des chiffres oscillant entre 1/10 et 1 unité; donc, chez 48,35 p. 100, elle était comprise entre 1 et 10 unités et plus. Or, dans l'essai de Vincennes, rapporté plus haut, cette dernière catégorie se chiffrait par un taux de 60 p. 100, après injection de 30 unités anatoxiques, contre 44,28 obtenu avec les 64 unités au total injectées à Berck.

Voici d'ailleurs un tableau récapitulatif qui permet de comparer les bénéfices obtenus respectivement à la suite de l'emploi de l'anatoxine à 10 unités et à 16 unités, enfin de la vaccination associée telle qu'elle a été pratiquée à Vincennes.

Teneur en antitoxine au centimètre cube.

MÉTHODE DE VACCINATION EMPLOYÉE	MOINS de 1/50 d'unité p. 100	DE 1/30 à 1/10 d'unité p. 100	AU-DESSUS de 1/10 d'unité p. 100	DE 1/10 à 1 unité p. 100	PLUS de 1 unité p. 100
Anatoxine à 10 unités : 3 injections = 30 unités anatoxiques. . . . .	3	15	80	"	"
Anatoxine à 16 unités : 3 injections = 64 unités (Berck) . . . . .	0	7,57	92,63	44,28	48,35
Vaccination associée, anatoxine à 15 unités : 1 injections = 30 unités (Vincennes) . . . . .	0	5	95	35	60

La lecture comparée des pourcentages figurant sur ce tableau, suivant les méthodes utilisées, est particulièrement éloquente.

A nombre égal d'unités anatoxiques, la vaccination associée avec deux injections de l'anatoxine à 15 unités se montre supérieure dans ses effets immunisants à la vaccination par l'anatoxine à plus faible teneur utilisée seule; elle est même capable de déterminer la production d'une immunité plus solide avec 30 unités (95, au lieu de 92 p. 100, au-dessus de 1/10, et 60 p. 100

de ces derniers, au lieu de 48,35, au-dessus de 1 unité) *que la seule anatoxine à teneur élevée avec 64.*

Certes, le degré d'immunité conférée n'est pas toujours égal à lui-même dans tous les cas; il peut varier de  $1/30$  d'unité à 40 unités antitoxiques; on sait d'ailleurs que les individus ne réagissent pas d'une façon univoque devant la vaccination; certains même n'acquièrent que l'immunité-limite ( $1/30$  d'unité) au-dessous de laquelle ils peuvent être exposés à contracter la diphtérie quand survient une cause de fléchissement de la résistance, soit locale, soit générale. D'autres s'immunisent lentement; c'est sans doute le cas de ce cavalier du 6<sup>e</sup> Dragons, dont l'atteinte est apparue près d'un mois après la deuxième injection, avant que l'immunité ne se soit complètement installée; l'hypothèse est d'autant plus légitime que chez deux hommes vaccinés aux mêmes dates que ce dernier, le taux d'antitoxine, qui n'atteignait que  $1/30$  le 7 janvier, s'élevait à  $1/10$  le 26 (soit dix-neuf jours après lors du deuxième prélèvement dont ils avaient été l'objet).

D'ailleurs, en vue de remédier à ces déficiences relatives, exceptionnelles à vrai dire, rien ne semble devoir s'opposer à ce que soit accrue la dose d'anatoxine qui a été utilisée lors de la deuxième injection dans cet essai de Vincennes; sans crainte de plus fortes réactions, il paraît indiqué de la porter de 1 cent. cube à 1 c. c.  $1/2$ , soit au total de 30 à 37,5 unités. D'après ce que l'expérience a appris à connaître de l'influence des doses injectées, le degré d'immunité et sa rapidité de production ne pourraient qu'en bénéficier.

Si l'on en juge d'après les résultats acquis à la faveur de l'expérimentation qui précède, l'avantage présenté par l'association du T. A. B. et de l'anatoxine à 15 unités n'est pas discutable.

Il ne l'est pas moins dans l'ordre pratique, quand on compare entre eux les faits qui se sont déroulés à Vincennes et à Colmar :

A Vincennes, parmi les hommes du contingent d'octobre 1931, qui ont subi deux injections de vaccin associé avec une anatoxine de 15 unités (soit 30 unités), aucun cas de diphtérie n'était encore apparu chez les vaccinés dix mois après la vaccination, alors qu'à Colmar on constatait l'éclosion de 5 atteintes

six et huit mois après la vaccination par la seule anatoxine (37,5 unités).

A Colmar, dans le même régiment, les 5 cas précédents sont donc apparus chez les hommes vaccinés avec la seule anatoxine, alors qu'on ne compta aucune atteinte chez les jeunes soldats qui avaient été vaccinés lors de l'incorporation d'avril 1932 à l'aide de trois injections de vaccin associé (soit 30 unités d'une anatoxine à 10 unités).

Ces constatations comparatives confirment donc la supériorité indéniable des résultats obtenus à la faveur du renforcement de l'immunité conférée par l'association du T. A. B. à l'anatoxine titrant 15 unités. Les prévisions formulées par Ramon et Debré étaient donc bien justifiées.

\*  
\* \*

Ces faits paraissent intéressants à retenir pour la pratique générale de la vaccination antidiphtérique, mais plus particulièrement encore dans son application en milieu militaire.

Dans l'armée, où les mesures de prophylaxie sont d'autant plus faciles à réaliser qu'elles gênent moins l'exécution du service, la réduction apportée comporte un grand intérêt, surtout dans les nations où le service à court terme impose, vis-à-vis de l'instruction des troupes, des obligations que le Service de Santé est tenu de respecter le plus qu'il est en son pouvoir. Le milieu militaire est donc appelé à bénéficier hautement de l'acquisition des notions relatives à l'efficacité de l'anatoxine à teneur élevée.

De plus, ce nouveau procédé aura le précieux avantage d'abréger de quinze jours la durée de la période pendant laquelle s'installe l'immunité; il réduira ainsi le délai nécessaire pour obtenir la cessation d'une épidémie; en ce qui concerne les manifestations endémiques, la même réduction sera apportée à la période « creuse » pendant laquelle les réceptifs nouvellement incorporés sont exposés à contracter la diphtérie avant qu'ils aient eu le temps d'acquérir la résistance cherchée.



### Conclusions.

I. Les mesures prophylactiques classiques destinées à éviter la contagion de la diphtérie dans l'armée se sont montrées nettement insuffisantes; elles n'ont pas empêché cette infection de s'accroître malgré leur exécution intégrale.

II. La vaccination préventive par l'anatoxine de Ramon associée à la vaccination antitypho-paratyphoïdique a donné d'excellents résultats. Partout où elle a été mise en pratique, la diphtérie a pour ainsi dire disparu chez les vaccinés, alors qu'elle a continué à se manifester chez les non-vaccinés, et chez les sujets qui ont été vaccinés incomplètement. Son pouvoir immunisant est donc indéniable.

III. Cette vaccination associée est douée également, et par là-même, d'un haut pouvoir prophylactique sur les manifestations *épidémiques* de la diphtérie: elle est capable de les juguler en peu de temps.

Ce pouvoir s'exerce également sur ses manifestations *endémiques* dont la ténacité résiste aux mesures anticontagieuses classiques; mais son efficacité *varie suivant les cas*:

Parfois l'endémie s'éteint rapidement après une seule vaccination. Souvent, l'extinction n'est que passagère et l'infection réapparaît surtout à l'époque d'une nouvelle arrivée de jeunes soldats: d'où la nécessité de vacciner les divers contingents au fur et à mesure de leur incorporation.

L'exécution de cette mesure a été couronnée de succès; il a suffi le plus souvent de deux ou trois vaccinations successives pour obtenir l'extinction de l'endémie. En quelques cas cependant, quand l'endémie est très marquée, le résultat est incomplet; il est dû au réveil de l'infection par des recrues qui contractent la diphtérie dès leur arrivée au corps, soit avant la vaccination, soit pendant son décours, en tout cas avant que l'immunisation vaccinale ne soit acquise. Ces faits sont de nature à imposer, en pareil cas, les vaccinations successives lors de chaque incorporation, tant que dure l'endémie.

Enfin, dans tous ces cas, il va sans dire qu'il faut veiller étroitement à l'application rigoureuse et intégrale de la méthode à

tous les sujets dûment reconnus réceptifs, de façon que tous soient mis à l'abri de l'infection.

IV. L'armée a déjà retiré et retirera encore de la mise en pratique des vaccinations associées un bénéfice impressionnant. Cette méthode constitue une arme puissante, capable de s'opposer victorieusement à la persistance de la diphtérie dans les régions d'endémie, et au développement des épidémies qui peuvent survenir. Elle mérite d'être largement mise en œuvre dans toutes les circonstances où elle sera jugée nécessaire. La tâche du Service de Santé militaire sera, à cet égard, facilitée par l'application de la loi du 21 décembre 1931, qui a rendu la vaccination antidiphtérique obligatoire dans l'armée. On connaît déjà les bienfaits qui sont nés de la loi du 28 mars 1914 sur le caractère obligatoire de la vaccination antityphoïdique dans ce milieu. La loi nouvelle, dont l'article 2 recommande spécialement la vaccination associée, sera riche en heureux résultats ; diminution notable de la morbidité et de la mortalité diphtériques, d'où bénéfice considérable obtenu pour l'instruction de la troupe, dont la durée de service est actuellement réduite à un an ; d'où également économie budgétaire importante entraînée par la diminution du nombre des journées d'hôpital pour le seul compte de la diphtérie et de ses complications, de même encore par la diminution des indemnités dues par l'Etat au titre du budget des pensions.

A tous ces points de vue, la vaccination de la troupe contre la diphtérie est appelée à rendre des services inappréciables, surtout si, comme il faut l'espérer, l'emploi d'une anatoxine à teneur élevée permet d'accroître l'immunité et de la rendre plus solide malgré la réduction du nombre des injections.

# **NOUVELLE CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES ÉLÉMENTS FILTRABLES DU VIRUS TUBERCULEUX**

par M. C. NINNI.

Les études et les recherches expérimentales sur les éléments filtrables du bacille de Koch sont maintenant assez avancées pour justifier la synthèse des faits actuellement connus.

Si Fontès a eu le mérite de constater le premier la filtrabilité du virus tuberculeux — ce que, douze ans plus tard, Vaudremer a confirmé —, on doit reconnaître que c'est principalement Calmette qui, par ses travaux avec ses collaborateurs, et grâce au prestige de son autorité, a porté la question à l'ordre du jour de la discussion mondiale. Les recherches de Calmette et de son école — Valtis, Nègre, Boquet, Saenz, de Sanctis Monaldi, Van Deinse, Certonciny, Van Beneden, ainsi que les nôtres —, ont accumulé un tel nombre de faits que toute critique tendant à nier l'existence de l'ultravirus tuberculeux est désormais impossible ou tout au moins inutile.

Les recherches postérieures de F. Arloing, Em. Sergent, Besançon, L. Bernard, Lydia Rabinowitsch et de leurs collaborateurs, celles de l'école italienne parmi lesquelles il faut citer en premier lieu Casagrandi, Gardenghi, Manfredi et Parrino, Verdina, de Bonis, les récents et intéressants travaux expérimentaux de Sanarelli et Alessandrini, et ceux de beaucoup d'autres auteurs, surtout américains, ont non seulement confirmé les faits mis en lumière par Calmette et ses collaborateurs, mais démontré que les propriétés si particulières de l'ultravirus tuberculeux offrent une grande importance doctrinale.

Nous sommes principalement redevables à J. Valtis, l'un des collaborateurs de Calmette, d'avoir pu, par ses expériences nombreuses et variées, réunir une moisson de faits qui nous renseignent sur la filiation existant entre l'ultravirus invisible

et le virus tuberculeux visible que représente le bacille de Koch tel qu'il nous est connu depuis un demi-siècle.

Ce qui, jusqu'à présent, semble manquer à nos connaissances sur l'ultravirus tuberculeux, c'est une interprétation exacte de sa fonction pathogène. Nos recherches personnelles, poursuivies sans interruption depuis trois ans, nous permettent d'avoir une opinion à ce sujet, puisqu'elle est basée sur un très grand nombre d'expériences. C'est cette opinion que nous nous proposons d'exposer et de justifier dans le présent mémoire, avec l'espoir que sa discussion suscitera d'autres travaux et nous rapprochera davantage de la découverte de la vérité.

#### VOIES D'INOCULATION.

Toutes les voies d'inoculation sont bonnes pour mettre en évidence les caractères particuliers de l'infection produite par les éléments filtrables, vivants, du bacille de Koch, mais les meilleures sont celles qui permettent de déceler les bacilles acido-résistants issus de l'ultravirus tuberculeux à l'endroit même de l'inoculation des filtrats. Puisque les bacilles acido-résistants nés des éléments filtrables vivants du bacille de Koch sont décelables dans les ganglions lymphatiques; puisque le bacille de Koch se dissémine lui-même par la voie lymphatique et s'installe dans les ganglions où il trouve les conditions les plus favorables à sa vitalité et à sa multiplication, il nous a paru indiqué de recourir à l'inoculation directe du filtrat des différents produits tuberculeux dans les organes lymphatiques eux-mêmes, en l'espèce, *dans les ganglions cervicaux du cobaye* (1). Ces ganglions, placés latéralement à la trachée, sont

(1) Si les produits suspects de tuberculose (pus, crachats, urines, liquides céphalo-rachidiens ou pleurétiques) sont inoculés directement à la dose de 0 c. c. 4 à 0 c. c. 8 dans les ganglions lymphatiques cervicaux, on trouve, dans les cas de tuberculose, des bacilles de Koch typiques dans les frottis des ganglions inoculés et prélevés huit à douze jours après. Il se développe, en outre, une tuberculose générale qui est beaucoup plus rapide et plus grave que celle produite par les mêmes liquides inoculés par voie sous-cutanée, même à dose cinq à dix fois plus grande. Ce fait, mis par nous en évidence, permet un diagnostic précoce de l'infection tuberculeuse, particulièrement dans les cas où les bacilles sont peu virulents, par exemple dans la tuberculose rénale, où l'épreuve biologique par voie sous-cutanée est souvent négative ou donne lieu à une tuberculose à allure très lente. Ceci ressort non seulement de nos recherches personnelles, mais aussi de celles de Véran, de Ballet (communication personnelle), de Brook, de Balteanu, Toma



les seuls pratiquement accessibles chez cet animal, parce qu'en raison de leurs dimensions ils permettent facilement l'introduction de 0 c. c. 2 à 0 c. c. 5 d'un liquide quelconque dans chacun d'eux, préalablement mis à nu. Les avantages que présente cette technique pour l'étude de l'ultravirus tuberculeux sont à la fois d'ordre pratique et d'ordre théorique.

D'ordre pratique : l'un des ganglions inoculés peut être facilement extirpé après un laps de temps quelconque pour la recherche des bacilles acido-résistants dérivés des éléments filtrables, s'il en existe, et cela sans qu'il en résulte aucun dommage pour l'animal. De cette façon, le cobaye conservé en vie sert lui-même de contrôle, car l'absence ultérieure, chez lui, de toute lésion tuberculeuse du type Villemin, prouve que la filtration a été effectuée avec une technique précise et que le filtrat contenait uniquement les éléments filtrables du virus tuberculeux.

D'ordre théorique : puisqu'elle écarte définitivement l'idée émise par un certain nombre d'auteurs, d'après laquelle les faits expérimentaux obtenus par l'inoculation de filtrats tuberculeux seraient dus simplement à une infection paucibacillaire provoquée par quelques bacilles qui auraient traversé la bougie. En effet, si, avec quelques dixièmes de centimètre cube, on peut déceler des bacilles acido-résistants dans les ganglions directement inoculés et si, avec 10 cent. cubes du même filtrat inoculé sous la peau du cobaye, on ne provoque jamais l'infection tuberculeuse classique, l'argument ci-dessus n'a aucune valeur, car 10 bacilles sont suffisants pour donner la tuberculose classique selon Calmette, et peut-être même un seul bacille, selon les constatations anciennes de Findel et celles récentes de Valtis, de B. Lange, de W. Lewinthal, de Vamoscher et Stœchlin.

Avec cette technique, en inoculant des filtrats de voiles jeunes, développés en milieu de Sauton, d'une souche de

et Boeriu. Cela démontre la grande électivité du tissu lymphatique pour le bacille tuberculeux et, par conséquent, pour l'ultravirus tuberculeux qui en est une forme de virulence très atténuée. Par conséquent, on ne peut pas attacher d'importance à l'affirmation de Petragani que « la conception de l'électivité du tissu lymphatique pour l'ultravirus tuberculeux est une conception aussi grossière que celle qui identifie le filtre placentaire aux bougies filtrantes ».

bacille tuberculeux type bovin très virulente (souche Vallée), nous avons réussi à mettre en évidence des bacilles acido-résistants chez 41 p. 100 de nos cobayes sur 34, et chez 30 p. 100 sur 17 animaux également inoculés par voie ganglionnaire avec le broyage des ganglions des cobayes précédents, en apparence privés de bacilles.

Ces faits ont été, dans leur ensemble, confirmés par de Sanctis Monaldi, de Blasio, de Bonis, Vêran, Aubertin et Reynes, Manfredi et Parrino, Lanza, Cuturi et Lanza.

Par contre, Ferranti, Callerio n'ont réussi à mettre en évidence aucun bacille acido-résistant dans les ganglions inoculés avec des filtrats de bacille de Koch.

Capuani, ayant trouvé seulement des granulations acido-résistantes dans la proportion de 10 à 40 p. 100 dans les ganglions directement inoculés avec des filtrats de culture, interprète ces granulations comme étant des résidus des lipides (cires et graisses) du bacille de Koch, capables de traverser la bougie.

De leur côté, Schmidt, Oomen, et tout récemment Dessy, ont trouvé quelquefois des bacilles acido-résistants dans les ganglions inoculés avec du filtrat tuberculeux, mais ils pensent que ces bacilles sont préexistants dans les ganglions et qu'ils ne résultent pas de la multiplication jusqu'à la phase visible des éléments filtrables vivants.

Les recherches de ces derniers auteurs, qui tendent à nier l'existence de l'ultravirus tuberculeux, sont en contradiction évidente entre elles parce que, ou bien il faut admettre, selon la thèse de Schmidt, Oomen et Dessy, la préexistence possible de bacilles acido-résistants dans les ganglions lymphatiques (vieil argument de Thomson et Frobischer jamais confirmé) et, dans ce cas, pourquoi ces auteurs n'ont-ils pas réussi à cultiver ces bacilles, et pourquoi Callerio en particulier (qui a poursuivi de longues recherches sous la direction de Veratti d'abord et de Friedberger ensuite) n'a-t-il jamais rencontré même la plus minime forme acido-résistante?

Ou bien il faut admettre la thèse de Capuani de la désagrégation des enveloppes ciro-graisseuses du bacille de Koch et de leur passage à travers la bougie filtrante, et alors on n'arrive pas à comprendre pourquoi Callerio et Ferranti, pas plus que Oomen, Schmidt et Dessy, n'ont rencontré les dites granula-

tions, ni pourquoi Petraghani, qui a maintenu pendant quarante jours sa bougie filtrante dans les milieux de culture de bacille de Koch à l'étuve, n'a pas constaté dans les filtrats la moindre granulation acido-résistante ayant pu provenir des particules ciro-graisseuses des bacilles morts désagrégés.

Ces affirmations négatives et contradictoires, en partie explicables par une observation insuffisante, ne valent rien à l'encontre de tant de faits démontrant la présence de bacilles acido-résistants vivants, issus des éléments filtrables, dans les ganglions des cobayes directement inoculés avec du filtrat tuberculeux, mais elles doivent nous inciter à tâcher de découvrir les causes de l'inconstance des résultats et les moyens d'éviter celles-ci.

#### TECHNIQUES DE PRÉPARATION DU MATÉRIEL DE CULTURE À FILTRER.

Au cours de nos recherches, nous avons observé qu'avec la même souche bacillaire on peut obtenir tantôt un filtrat qui donne naissance à des bacilles acido-résistants chez presque tous les cobayes inoculés, tantôt un filtrat qui fournit des résultats constamment négatifs. Il apparaît donc que la préparation même des filtrats de cultures doit être faite dans certaines conditions qu'il s'agit de préciser.

Ces conditions sont multiples, et leur connaissance, d'ailleurs encore incomplète, réduit les échecs.

Les unes sont communes à toutes les expériences de filtration des virus. Il faut, par exemple, éviter le colmatage rapide de la bougie en filtrant préalablement la suspension microbienne, convenablement diluée, sur papier très perméable. Les autres sont spéciales aux cultures de bacilles de Koch : il faut agiter longtemps les voiles jeunes avec des billes de verre et laisser pendant vingt-quatre heures à la glacière la suspension bactérienne aqueuse avant de la filtrer.

Si l'on compare, au point de vue chimique, les filtrats ainsi préparés, aux filtrats provenant de cultures simplement mises en suspension dans l'eau physiologique, on constate que la quantité de protéines bacillaires et de lipides est sensiblement plus grande dans les premiers; or les filtrats les plus riches en protéines donnent plus facilement *in vivo* des bacilles acido-

résistants. De plus si, au lieu de la solution physiologique, on emploie de l'eau salée à 5 p. 100 pour préparer les suspensions microbiennes, on constate, dans le filtrat de celles-ci, un accroissement sensible du taux des protéines bacillaires et — moins prononcé — des lipides. Parallèlement, les échecs dans les résultats de l'inoculation de l'ultra-virus diminuent.

Il en résulte que la proportion des succès dépend de la technique de préparation du matériel à filtrer. Et si nous poussons plus loin l'examen, nous constatons qu'à ces conditions s'ajoutent d'autres encore plus importantes pour l'obtention des filtrats riches en éléments filtrables vivants.

#### L'ÉTAT GRANULAIRE DU VIRUS TUBERCULEUX CONDITIONNE L'EFFICACITÉ BIOLOGIQUE DU FILTRAT.

Les filtrats des différentes souches de bacille de Koch ne se comportent pas tous de la même manière : quelques-uns sont capables de donner naissance à des acido-résistants chez les animaux inoculés, d'autres non. C'est ainsi qu'une souche bovine d'origine équine, de la collection de l'Institut Pasteur, n'a jamais fourni un filtrat efficace quant elle était cultivée dans le liquide Sauton.

La souche bovine Vallée elle-même peut donner un filtrat biologiquement actif ou inactif suivant le matériel nutritif dans lequel le bacille est cultivé, suivant la température de l'éluve, suivant les lentes modifications que le microbe subit quand il est réensemencé indéfiniment dans le même liquide nutritif.

Si l'on examine au microscope les cultures jeunes avant de les filtrer, on observe que les probabilités de mettre en évidence des bacilles acido-résistants vivants, issus des éléments filtrables, sont en rapport direct avec la présence de granulations acido-résistantes libres ou incluses dans les formes bacillaires ; si les bacilles sont en bâtonnets réguliers, pleins, et qu'en même temps on ne trouve pas de granulations libres, on peut dire presque avec certitude que le filtrat sera biologiquement inactif.

Mais l'importance de l'état granulaire du bacille pour révéler biologiquement les éléments filtrables vivants ressort encore mieux des données suivantes :



1° Si l'on filtre des cultures de bacilles paratuberculeux doués d'un certain pouvoir pathogène pour le cobaye (paratuberculeux de Saenz, Darier, Friedmann, Johnne), on observe qu'avec une constance presque absolue les filtrats correspondants, inoculés dans les ganglions lymphatiques cervicaux, donnent des bacilles acido-résistants capables de multiplication, même *in vitro*, dans le liquide de Sauton. Ce qui caractérise ces souches bacillaires, c'est la présence d'un grand nombre de formes granulaires acido- et non acido-résistantes, libres ou faisant partie des corps microbiens. Le bacille de Friedmann, qui, dans le liquide de Sauton, donne des bacilles peu ou pas granulaires, et sur la pomme de terre glycinée beaucoup de formes granulaires, nous a fourni des filtrats actifs *in vivo* en partant des cultures sur pomme de terre, et seulement une fois en partant des cultures en liquide de Sauton.

L'expérience est encore plus démonstrative si l'on expérimente avec le bacille tuberculeux aviaire, qui ne possède qu'un très faible pouvoir pathogène — cependant non négligeable — pour le cobaye, surtout s'il est inoculé par voie lympho-glandulaire. On sait que, dans les cultures, ce bacille se développe plus rapidement que les types « mammifères », et, en plus, qu'il présente un état granulaire presque constant. Les filtrats, préparés avec la culture de bacille aviaire virulent, et mieux encore les filtrats préparés avec le foie ou la rate de poule tuberculeuse, ou avec ces mêmes organes de cobaye mort vingt à trente jours après l'inoculation d'un bacille aviaire virulent dans les ganglions cervicaux, sont toujours biologiquement efficaces.

2° Si l'on filtre des produits tuberculeux de l'homme ou des animaux, la probabilité d'obtenir des éléments filtrables biologiquement efficaces est considérablement plus grande qu'avec les filtrats de cultures. Les meilleurs produits sont ceux qui proviennent d'infections tuberculeuses aiguës ou qui sont prélevés pendant une période aiguë de l'infection tuberculeuse, même si les bacilles tuberculeux n'y sont pas nombreux. Or, le nombre de formes bacillaires qui se trouvent dans n'importe quel produit pathologique est toujours très inférieur à celui qui se trouve dans une culture en milieu de Sauton par exemple; mais, par contre, le nombre des formes granulaires

est beaucoup plus grand dans ces produits pathologiques.

Mieux encore : si l'on examine au microscope un pus tuberculeux de provenance humaine ou animale, il est parfois très difficile d'y découvrir des bacilles de Koch, tandis qu'il n'est pas aussi difficile d'y rencontrer des granulations acido-résistantes ou même des granulations de Much : le filtrat de ces pus, s'il est de formation récente chez l'homme ou l'animal, est biologiquement actif.

Dans l'urine des malades atteints de tuberculose rénale, les bacilles, nombreux ou non, sont granuleux ; aussi les filtrats de ces urines donnent-ils très facilement des bacilles acido-résistants dans les ganglions lymphatiques inoculés.

3° On peut à volonté transformer une souche bacillaire dont le filtrat est biologiquement inefficace, en une souche bacillaire à filtrat biologiquement efficace. Si l'on prend la souche bovine Vallée, dont la virulence a sensiblement baissé depuis quelque temps, et qui, cultivée en milieu de Sauton, fournit maintenant des voiles dont les filtrats ne donnent que par exception un développement de bacilles acido-résistants chez les animaux, et si on la cultive pendant sept à neuf jours dans du bouillon glycérimé additionné de foie frais de cobaye, le filtrat entier (bouillon et foie broyé) est si riche en ultra-virus tuberculeux que les bacilles acido-résistants qu'on en obtient d'emblée chez l'animal peuvent se multiplier *in vitro* jusqu'à donner des micro-colonies, à condition d'ensemencer la rate des animaux inoculés avec ce filtrat dans les milieux à l'œuf et à l'asparagine. La raison de ces faits n'est pas dans un développement microbien plus luxuriant — car la culture est plutôt chétive —, ou dans une substance éventuelle qui manquerait aux éléments filtrables vivants pour se transformer en bacilles acido-résistants ; elle est dans cette constatation que le foie frais, peut-être par l'action de ses ferments, favorise le développement du bacille de Koch et celui des formes granulaires libres ou incluses dans le corps bacillaire. En effet, si l'on emploie pour cette expérience du bouillon glycérimé et du foie déjà vieux, le filtrat n'est plus actif que d'une façon inconstante *in vivo*.

4° Si l'on inocule des cobayes avec des doses suffisamment élevées de bacille de Koch de type humain ou bovin (0,1 à

0,01 milligramme) [particulièrement par la voie lympho-ganglionnaire qui permet une rapide dissémination dans tout l'organisme des bacilles inoculés], ces animaux font une forme de tuberculose aiguë miliaire. Les filtrats préparés avec le foie ou la rate de ces animaux (sacrifiés ou morts entre le vingtième et le trentième jour de l'infection, au moment où les très nombreux tubercules ne sont pas encore caséifiés), inoculés à des cobayes par voie lympho-ganglionnaire, donnent naissance à des acido-résistants capables de se multiplier même *in vitro* sous forme de micro-colonies.

Si l'on inocule des cobayes par voie lympho-ganglionnaire avec quelques milligrammes de bacilles aviaires, faiblement mais nettement pathogènes, et si l'on procède à la préparation du filtrat du foie ou de la rate de ces cobayes infectés et sacrifiés ou morts vers le vingtième ou le trentième jour, ce filtrat, surtout préparé avec des émulsions de l'organe dans de l'eau salée à 5 p. 100, donne, chez les cobayes inoculés, des acido-résistants qui se multiplient *in vitro* sous forme de micro-colonies.

Cette mise en évidence plus aisée des éléments filtrables vivants est manifestement en corrélation avec la forme granulaire. En effet, pour ce qui concerne le bacille aviaire, nos recherches ont prouvé que, pendant les quinze à vingt premiers jours après l'inoculation lympho-ganglionnaire, on voit se développer une forme septicémique type Yersin, avec une richesse relative en formes bacillaires dans le foie et dans la rate; plus tard les formes bacillaires disparaissent et l'on observe seulement des granules libres; or, le filtrat est surtout ou exclusivement efficace s'il est préparé avec le foie ou la rate prélevés au début de l'époque au cours de laquelle prédomine la forme granulaire libre du bacille.

On doit donc admettre que, pratiquement, les filtrats provenant de bacilles naturellement granuleux, ou rendus artificiellement granuleux, contiennent des éléments filtrables vivants en nombre tel et doués d'une telle vitalité qu'ils peuvent donner lieu au développement de bacilles acido-résistants dans l'organisme.

QUELS SONT LES ÉLÉMENTS  
QUI TRAVERSENT LES BOUGIES CHAMBERLAND L2?

Si l'on tirait, de ce qui précède, cette conclusion que les éléments qui passent à travers les bougies Chamberland L2 sont les granulations acido-résistantes, on se tromperait beaucoup. Les granulations acido-résistantes libres, pas plus que les bacilles acido-résistants eux-mêmes, ne traversent jamais les bougies filtrantes soigneusement contrôlées, non seulement à cause des phénomènes d'adsorption et d'adhésion communs à tous les filtres vis-à-vis des microbes, mais surtout à cause de la présence des lipides qui entourent ceux-ci et qui ne filtrent pas.

En effet si, à une solution de protéine dans de l'eau physiologique, on ajoute de l'huile d'olive dans la proportion de 10 p. 100, ou encore des cires et des graisses extraites du bacille de Koch, dans la proportion de 1 p. 100, en s'efforçant naturellement de bien incorporer lesdits lipides dans le véhicule liquide, et qu'on filtre ensuite, on constate par l'analyse chimique que ce filtrat ne contient aucune trace des huiles ou lipides ajoutés, et que ceux-ci restent entièrement à l'extérieur du filtre. Donc les lipides, s'ils sont libres, ne traversent pas les filtres de porcelaine dans les conditions ordinaires de filtration.

Si on laisse évaporer à 37°, dans une boîte de Petri stérile inclinée, 5 ou même 10 cent. cubes de filtrat de voiles de cultures en Sauton, et puis qu'on reprenne avec quelques gouttes d'eau distillée une partie de cet extrait, qu'on le mette sur une lame et qu'après redessiccation on colore par le Ziehl-Neelsen, on n'observe jamais au microscope de granulations ni de particules acido-résistantes, mais seulement une substance amorphe, légèrement bleuâtre et des granulations infra-microscopiques bleues, plus ou moins nombreuses suivant les artifices employés dans la préparation des émulsions de voiles à filtrer.

Par conséquent, lorsque Capuani croit démontrer par ses expériences que les bacilles acido-résistants perceptibles dans les ganglions de cobayes directement inoculés avec des filtrats de cultures de bacilles de Koch sont des amas de substance cireuse simulant la forme bacillaire parce que, par passages de



cobaye à cobaye, ces formes disparaissent, il n'apporte en réalité aucune preuve de l'exactitude de son affirmation. Au contraire, ses expériences démontrent que les granulations fortement acido et alcoolo-résistantes, vues par lui dans les ganglions inoculés avec ses filtrats, sont les équivalents morphologiques rudimentaires et initiaux des bacilles acido-résistants issus de la multiplication *in vivo* des éléments filtrables.

Que les lipides libres ne traversent pas les filtres est encore prouvé par cette expérience de Petraghani d'après laquelle si, pendant quarante jours, on maintient des bougies filtrantes immergées dans un liquide de cultureensemencé avec du bacille de Koch ou avec d'autres microbes (bacilles typhique, *coli*, etc.), on constate que, dans le filtrat, on ne retrouve ni bacille de Koch, ni granulations acido-résistantes; donc, ces formes acido-résistantes ne passent pas à travers les bougies, même dans ces conditions anormales de filtration. Mais puisque, d'après Petraghani, les autres microbes, bacilles typhiques, *coli*, se retrouvent dans le filtrat, on doit en déduire que la raison pour laquelle les granulations et les bacilles acido-résistants ne passent pas à travers les filtres est sans doute l'enveloppe lipidique qui les entoure. Etant donnée cette manière différente de se comporter des microbes acido-résistants et des bactéries non acido-résistantes vis-à-vis des filtres, on doit envisager comme s'exerçant de toute autre manière le rôle de la grosseur des particules et celui des phénomènes d'adsorption des colloïdes protéiques dans la filtration. C'est surtout la présence de l'enveloppe lipidique du bacille de Koch qui rend impossible le passage de quelques unités bacillaires à travers la bougie. Et puisque l'enveloppe lipidique se trouve aussi bien dans les bacilles tuberculeux vivants que dans les bacilles tuberculeux morts ou tués, nous n'avons aucune raison de croire qu'à travers les filtres de porcelaine passent des bacilles tuberculeux morts qui se retrouveraient ensuite dans les ganglions des cobayes inoculés avec le filtrat. Le papier à filtrer lui-même suffit à retenir la plupart des bacilles de Koch d'une culture âgée de quelques semaines, alors que d'autres microbes, privés d'enveloppe lipidique, comme le *B. coli*, ne sont pas retenus du tout. Et on ne relève aucune différence entre le filtrat sur papier de bacille de Koch vivant et le filtrat sur papier

des mêmes germes tués par chauffage ou par l'action des substances antiseptiques.

Par conséquent, les arguments de B. Lange et de Schmidt, qui considèrent les bacilles acido-résistants trouvés *in vivo* après l'inoculation d'éléments filtrables vivants comme résultant du passage possible à travers la bougie filtrante de rares unités bacillaires vivantes ou d'un plus grand nombre d'unités bacillaires mortes, n'ont aucun fondement.

A travers la bougie Chamberland L2 passent seulement la substance bacillaire amorphe et les granulations infra-microscopiques non acido-résistantes. Les lipides de ces éléments filtrables sont intimement combinés et protégés, sous forme de complexes, ainsi que le prouve l'absence presque totale de propriétés antigènes *in vitro* dans le filtrat tel quel, et, au contraire, l'apparition de propriétés antigènes dans le même filtrat si, après l'avoir desséché, on l'extrait par l'alcool qui met en liberté les lipoides du complexe.

LES BACILLES ACIDO-RÉSISTANTS  
DANS L'INFECTION DIRECTE ET DANS L'INFECTION HÉRÉDITAIRE  
PAR L'ULTRAVIRUS TUBERCULEUX.

Quelle que soit la voie d'inoculation, le filtrat, s'il est préparé dans les conditions que nous venons d'exposer, donne naissance, dans les ganglions des cobayes inoculés, à des éléments bacillaires acido-résistants grêles, atypiques, courts, accompagnés parfois de granulations et le plus souvent réunis en forme de petits buissons. Ces formes acido-résistantes ne peuvent pas être confondues avec le vrai bacille de Koch ni avec les bacilles paratuberculeux. Leur caractéristique est d'apparaître après quelques jours et de disparaître assez rapidement, c'est-à-dire dans le délai d'environ un mois. Par exception, nous avons pu en retrouver deux mois après l'inoculation chez des cobayes femelles pleines et ayant avorté. Même par les passages de cobaye à cobaye il est difficile de les mettre en évidence s'il s'est écoulé plus d'un mois depuis l'inoculation. Ce n'est que rarement qu'il nous est arrivé d'en trouver dans les ganglions lymphatiques chez les cobayes inoculés avec la rate de cobayes femelles pleines et ayant avorté, sacrifiées deux mois après

l'inoculation du filtrat : mais ces cobayes femelles avaient reçu par fractions 20 à 27 cent. cubes de filtrat d'organes tuberculeux.

Par des artifices particuliers, comme par exemple l'inoculation bi-hebdomadaire d'extrait acétonique de bacilles tuberculeux, il est facile d'obtenir une plus longue survivance de ces formes acido-résistantes, ainsi que Nègre et Valtis l'ont montré, et comme je l'ai vérifié maintes fois.

Chez les cobayes gravides inoculés avec le filtrat, il est plus aisé et plus constant d'en trouver. Chez les cobayes sains en apparence, mais affectés de pseudo-tuberculose ou de pasteurellose à évolution lente, il est presque impossible de déceler des bacilles vivants provenant des éléments filtrables.

Les formes acido-résistantes s'observent surtout *in loco*, ou dans les ganglions lymphatiques les plus proches. C'est pour cela que l'inoculation d'environ 0 c. c. 8 de filtrat par voie lympho-ganglionnaire (particulièrement quand la plus grande partie de liquide injecté reste bien dans le tissu ou dans la capsule ganglionnaire) permet, de même que l'inoculation de 8 à 10 cent. cubes de filtrat par voie péritonéale chez des cobayes préparés avec du phosphate de calcium suivant la méthode de Van Deinse, de déceler plus facilement et plus abondamment les formes acido-résistantes issues de l'ultravirus.

Après l'inoculation sous-cutanée dans l'aîne, il nous a été plus facile de découvrir des bacilles dans les ganglions lymphatiques inguinaux légèrement hypertrophiés, que dans les ganglions trachéo-bronchiques.

Répetons que la caractéristique de ces bacilles est de disparaître promptement de l'organisme animal, ce qui enlève toute valeur aux objections sur lesquelles B. Lange a encore tout récemment insisté. S'il s'agissait de bacilles paratuberculeux préexistants dans les ganglions lymphatiques, pourquoi disparaîtraient-ils quinze à vingt jours après l'inoculation d'un liquide plus ou moins toxique?

Et s'il s'agissait de bacilles tuberculeux morts qui, malgré leur enveloppe lipidique, auraient traversé le filtre poreux, comment l'organisme pourrait-il les digérer ou les éliminer en quinze à vingt jours, alors qu'on ne réussit pas même à saisir les divers moments de la réduction dans le nombre et des

modifications qui surviennent dans la structure morphologique de ces bacilles morts ?

Il apparaît évident que l'autre objection de B. Lange n'a pas plus de valeur, à savoir que les bacilles acido-résistants qu'on trouve dans les ganglions inoculés avec les filtrats seraient des « splittern » du bacille de Koch. Il faut s'entendre sur ce mot. Si, par « splittern », B. Lange désigne de petites granulations détachées naturellement ou artificiellement du bacille de Koch, douées de vie et, par conséquent, capables de se multiplier jusqu'à constituer des bacilles acido-résistants, il serait un défenseur convaincu de l'ultravirus tuberculeux. Mais si, au contraire, par « splittern », B. Lange entend des particules mortes, de grosseur variable, acido-résistantes, fragments de bacilles de Koch capables de traverser le filtre malgré leur enveloppe de lipides et identifiables avec les bacilles typiques ou atypiques, sa conception ne résiste pas à l'expérience. Les bacilles acido-résistants qu'on trouve après l'inoculation de filtrats féconds sont morphologiquement différents des « fragments » bacillaires et, au surplus, rien n'autorise à penser qu'ils doivent échapper aux lois qui régissent la non-filtrabilité des bacilles morts et leur disparition de l'organisme.

Les bacilles acido-résistants issus des éléments filtrables vivants peuvent se multiplier *in vitro* dans les milieux à l'œuf et à l'asparagine, tels que ceux de Löwenstein, de J. Valtis et A. Saenz, ou de Petragani, ce dernier modifié par A. Saenz (substitution de l'asparagine à la peptone). Mais, pour cela, il faut deux conditions :

1° Que les filtrats proviennent de produits tuberculeux contenant sûrement des éléments filtrables en pleine vitalité et nombreux : tels sont les filtrats préparés avec le foie et la rate de cobayes sacrifiés ou morts d'infection tuberculeuse miliaire massive (vingt à trente jours après l'inoculation par voie lympho-ganglionnaire de 0,1 à 0 milligr. 01 d'un bacille tuberculeux virulent). Tels sont encore les filtrats provenant d'une culture de sept à neuf jours en bouillon glyciné + organes frais ensemencé largement, non seulement en surface, mais aussi en profondeur, avec un bacille de Koch virulent ;

2° Que la culture, pour mettre en évidence les bacilles acido-résistants issus des éléments filtrables chez les cobayes inoculés



avec les filtrats, soit préparée à partir de la rate, avec ou sans les ganglions lymphatiques inoculés ou les ganglions trachéo-bronchiques, parce qu'on peut considérer la rate comme le plus vaste et le plus pur réservoir d'ultravirus tuberculeux.

Bien entendu, ces cultures ne sont pas macroscopiquement visibles. On les découvre seulement par l'observation microscopique, en faisant l'examen du produit de raclage de la surface du milieu nutritif, vers le quinzième jour après l'ensemencement des organes convenablement traités par l'acide sulfurique.

Des microcolonies s'observent également en ensemençant le foie des fœtus ou de cobayes nouveau-nés dont les mères ont été inoculées, soit avec de fortes doses de bacilles tuberculeux, soit avec des doses fractionnées et répétées de filtrats tuberculeux sûrement efficaces. La présence de microcolonies dans ces cas est vérifiable seulement chez un tiers des fœtus ou des cobayes nouveau-nés et les bacilles sont peu abondants. Mais si, avec le foie de ces fœtus ou cobayes nouveau-nés, on inocule par voie intraganglionnaire et sous-cutanée des cobayes adultes, à partir de la rate et des ganglions lymphatiques des cobayes de passage sacrifiés vers le quinzième jour d'infection, on obtient, dans les trois-quarts des cas, des microcolonies quelquefois très riches en bacilles acido-résistants. Cette différence de pourcentage entre les cultures préparées avec le foie des fœtus ou des cobayes nouveau-nés et les cultures préparées avec la rate de cobayes inoculés avec ce foie résulte de ce que seulement un très petit nombre d'éléments filtrables ont eu le temps d'évoluer jusqu'à la phase bacillaire chez les petits cobayes nés de mères infectées quinze à vingt-cinq jours auparavant, tandis que, par les passages, d'autres éléments filtrables se développent jusqu'à la phase bacillaire qui est très probablement la seule capable de multiplication *in vitro*, dans les milieux artificiels.

La possibilité de déceler les bacilles acido-résistants dans les organes des fœtus et des nouveau-nés de mères tuberculeuses ou des petits cobayes inoculés avec des filtrats tuberculeux (soit directement au microscope sur les frottis de ganglions lymphatiques sous-hépatiques, soit dans les cultures par microcolonies) achève d'enlever toute valeur à l'opinion de B. Lange (*loc. cit.*) comme à celle d'autres auteurs, qui croient que les

bacilles acido-résistants qu'on découvre dans les ganglions lymphatiques de cobayes inoculés avec des filtrats tuberculeux sont des bacilles paratuberculeux vivants, préexistants, ou des bacilles tuberculeux vivants ou morts. En effet, il n'y a pas de raison d'admettre le passage à travers le placenta, même altéré, des seuls bacilles de Koch morts de la mère ou de bacilles paratuberculeux, tandis que les bacilles tuberculeux vivants et virulents seraient retenus par ce même placenta altéré. Il faut reconnaître, ou bien que tous les bacilles vivants ou morts (paratuberculeux saprophytes et bacilles de Koch) passent à travers le placenta, même s'il est très peu lésé, et alors on observerait toujours l'infection tuberculeuse *typique* (tandis qu'au contraire, dans le cas d'infection héréditaire par ultravirus tuberculeux, elle n'existe jamais); ou qu'aucun bacille ne passe lorsqu'il y a une complète intégrité du filtre placentaire, et alors les bacilles acido-résistants qu'on rencontre dans les infections héréditaires par ultravirus proviennent incontestablement des éléments filtrables vivants du virus tuberculeux. La logique veut que, si cette interprétation des faits est exacte pour les bacilles décelables dans le foie, les ganglions lymphatiques et les organes de fœtus et de nouveau-nés de mères tuberculeuses, elle doit être vraie aussi pour les bacilles acido-résistants décelables, microscopiquement ou par culture sous forme de microcolonies, dans les ganglions lymphatiques des cobayes inoculés avec du filtrat tuberculeux.

Il est vrai que l'infection héréditaire par ultravirus tuberculeux, démontrée d'abord par Calmette, Valtis, Nègre, Boquet et Lacomme, peu après par Arloing et Dufourt et confirmée depuis par une foule d'expérimentateurs particulièrement compétents et de cliniciens (Rabinowitsch, Van Beneden, de Bonis, Nasso, Jonesco, Marley, Priboiano, Couvelaire, Migliavacca, Montanari, Aiello, Brindeau et Cartier, Scarzella, Zuccola, Sergent, Durand et Benda, Tropeo et Mandolari, Saint-Girons, Scheer, Halfer, Cartier et Pongis, Valtis et Saenz, Valtis et Misiewicz, Vignal et Chevrotier, etc.), est niée par ceux qui n'admettent pas que le filtre placentaire puisse être comparé à une bougie de porcelaine poreuse (Petragnani, Veratti). Petragnani croit avoir démontré expérimentalement qu'on ne réalise l'infection héréditaire tuberculeuse que lorsque le placenta présente des

altérations tuberculeuses. Ses expériences, qui ont suivi et confirment celles de plusieurs autres auteurs, sont vraies en ce qu'elles se rapportent au passage transplacentaire du bacille de Koch normal et intact : c'est pourquoi la tuberculose classique d'origine transplacentaire ne se rencontre qu'exceptionnellement, aussi bien chez les animaux que dans l'espèce humaine. Mais cela n'a rien à voir avec le syndrome particulier produit par les éléments filtrables vivants du virus tuberculeux qui ont traversé le *placenta anatomiquement sain*, éléments filtrables qui nous sont révélés chez les nouveau-nés par l'apparition des bacilles acido-résistants qui peuvent en dériver.

Dans les conditions physiologiques normales, le placenta peut être considéré comme imperméable aux bacilles, non parce que ses pores sont plus petits que ceux d'un filtre de porcelaine, mais parce que c'est un organe qui transforme les matériaux colloïdaux qu'il reçoit, en exerçant, par les éléments épithéliaux de la caduque et par les villosités du chorion, une triple fonction : respiratoire, métabolique et excrétrice.

Les physiologistes nous ont appris que, plus les substances sont dialysables, plus elles passent facilement de la mère au fœtus. En effet, si l'on injecte du glucose dans les vaisseaux de la mère, ce sucre se retrouve en excès dans les tissus du fœtus. Si l'on injecte à la mère de l'atropine, on observe de la mydriase chez le fœtus. En intoxiquant la mère avec de la strychnine, on provoque la mort du fœtus. Le salicylate de soude, les bromures, les ferrocyanures, le chlorate de potasse, le sous-acétate de cuivre, la teinture d'iode, passent de la mère au fœtus. Même les substances faiblement dialysables, comme le curare, traversent le placenta intact.

Mais, vis-à-vis des substances colloïdales étrangères à l'organisme, le placenta se comporte différemment suivant que ces substances sont d'origine animale (mammifères, bien entendu) ou d'origine bactérienne. Des expériences déjà anciennes de Vaillard, celles plus récentes de Nattan-Larrier, de Ramon et Grasset ont montré que les antitoxines passent de la mère au fœtus, tandis que la toxine tétanique ne passe qu'en très faible quantité, et seulement si la dose inoculée à la mère est élevée. Ce n'est donc pas la grosseur des molécules albuminoïdes qui conditionne le passage à travers le placenta considéré comme

un filtre actif de retenue, parce qu'alors il se révélerait plus perméable à la toxine qu'à l'antitoxine; c'est seulement l'identité plus ou moins grande avec les protéines de l'organisme fœtal qui règle le passage ou l'arrêt à travers le placenta. Puisque les éléments filtrables du virus tuberculeux, ainsi que la toxine tétanique, sont des produits très différents des protéines de l'organisme, ils ne peuvent, dans les conditions de fonctionnement parfaitement normal du placenta, laisser passer de la mère au fœtus que des quantités très faibles de cet ultravirus.

Mais si cette quantité est pratiquement négligeable dans les cas de tuberculose maternelle circonscrite, stabilisée et non fébrile, la scène change quand la tuberculose est évolutive et fébrile. Alors les bacilles tuberculeux libèrent continuellement des quantités importantes d'éléments filtrables vivants, et ceux qui passent à travers le placenta sont en quantité suffisante pour franchir le foie du fœtus, infecter celui-ci et poursuivre ultérieurement leur évolution jusqu'au stade bacillaire. C'est en raison de ce fait que Calmette, Valtis, Nègre, Boquet et Lacomme (*loc. cit.*) ont pu démontrer que les bacilles acido-résistants issus des éléments filtrables se trouvaient surtout dans les fœtus et nouveau-nés de mères atteintes de tuberculose pulmonaire évolutive ou de tuberculose méningée. Et c'est en raison de ce même fait que nous avons pu déterminer expérimentalement une tuberculose aiguë chez les cobayes en état de gestation avancée et que nous avons pu démontrer, soit directement, soit indirectement par l'artifice des microcolonies, l'existence de bacilles acido-résistants dans le foie des fœtus et des nouveau-nés de ces mères tuberculeuses, tandis qu'il ne nous a pas été possible d'en rencontrer chez les nouveau-nés de mères porteuses de lésions peu étendues, limitées seulement à quelques ganglions lymphatiques.

C'est aussi pour cette même raison que plusieurs expérimentateurs n'ont pas réussi à reproduire l'infection héréditaire par l'ultravirus tuberculeux: ils ont cru qu'il suffisait d'une infection tuberculeuse maternelle quelconque pour obtenir le passage pur et simple, à travers le placenta, d'un virus supposé existant, alors que ce virus manquait dans le sang maternel.

On s'explique ainsi pourquoi, dans les expériences de Cal-



mette et ses collaborateurs, ainsi que dans les nôtres, il fut souvent plus facile d'obtenir les bacilles issus de l'ultravirus tuberculeux en inoculant à la mère, à plusieurs reprises, de fortes quantités de filtrats tuberculeux. Ce qui est indispensable pour que l'infection héréditaire par l'ultravirus se réalise, c'est la présence continuelle de beaucoup d'éléments filtrables vivants dans le sang de la mère, parce qu'alors le filtre placentaire, de même que le foie du fœtus, n'ont pas le temps de détruire les éléments filtrables, et ceux-ci peuvent se multiplier jusqu'à la phase visible. D'un autre côté on ne doit pas méconnaître que les troubles de la circulation, si fréquents pendant les états fébriles dans la tuberculose évolutive, modifient le fonctionnement placentaire normal et augmentent la perméabilité de cet organe aux colloïdes étrangers. En effet, la double membrane qui sépare le sang maternel du sang fœtal, constituée seulement par les parois très minces des capillaires maternels et par l'épithélium des villosités, peut en arriver à se comporter comme un filtre de collodion, ainsi que le prouvent des expériences très intéressantes de Nattan-Larrier et Richard. Ces auteurs, en effet, ont vu que si l'on inocule dans le cœur d'un cobaye femelle, pendant la gestation, un sérum hétérologue mélangé d'oléate de soude, le sérum hétérologue passe avec la plus grande facilité dans le sang fœtal. L'analyse de ce fait a prouvé qu'il n'est pas la conséquence d'une action toxique de l'oléate de soude, parce que le phénomène se reproduit même quand la quantité d'oléate ajoutée est très inférieure à la dose toxique : ce n'est plus la conséquence d'une modification du sérum hétérologue mélangé à l'oléate de soude, parce que le passage se produit aussi bien si le sérum hétérologue est inoculé par voie sous-cutanée et l'oléate dans la circulation sanguine. L'unique interprétation est que l'oléate de soude produit *in vivo* les mêmes effets sur les membranes cellulaires que ceux constatés par Bechhold *in vitro* avec les filtres de collodion dont la perméabilité peut être considérablement accrue par l'action de l'oléate sodique (1).

(1) On ne peut accorder aucune valeur aux critiques soulevées par Petraghani et Dessy au sujet de quelques faits rapportés par Sanarelli et Alessandrini dans leurs expériences sur l'ultravirus tuberculeux avec les sacs de collodion, parce que s'il est vrai que les sacs de collodion préparés par ces

Donc plusieurs conditions peuvent modifier la fonction normale d'arrêt du placenta et permettre le passage, en plus ou moins grande quantité, des éléments filtrables vivants.

#### EFFETS PATHOGÈNES DE L'ULTRAVIRUS TUBERCULEUX CHEZ LES COBAYES.

Le syndrome présenté par les animaux inoculés par n'importe quelle voie avec des filtrats actifs n'est pas tellement apparent qu'il puisse être saisi par un observateur peu averti.

Les animaux présentent une hypertrophie lympho-ganglionnaire qui atteint ou dépasse la grosseur d'un petit pois. Les autres ganglions de l'organisme participent aussi, quoique dans une mesure réduite, à cette hypertrophie qui est particulièrement perceptible dans les ganglions trachéo-bronchiques. L'absence complète d'hypertrophie lympho-ganglionnaire parle en faveur de l'inactivité du filtrat qui peut avoir été incorrectement préparé ou ne contenir qu'un trop petit nombre d'éléments filtrables vivants.

Mais ce qui frappe le plus, c'est l'augmentation du volume de la rate, deux à quatre fois plus grosse qu'à l'état normal. Celle-ci offre en outre une couleur rouge foncé (et non jaunâtre, comme elle l'est normalement chez les cobayes); elle est fréquemment couverte de petits points blanchâtres, rares ou nombreux, légèrement surélevés, correspondant aux corpuscules de Malpighi hypertrophiés. Cette hyperplasie splénique (constante chez les cobayes inoculés avec des filtrats préparés avec des organes de cobayes infectés de tuberculose aiguë et sacrifiés ou morts entre le vingtième et le trentième jour, ainsi que chez ceux qui ont été inoculés avec des filtrats de culture en bouillon glycérimé + organes frais) ne s'observe jamais avant le quinzième jour de l'inoculation et persiste pendant un mois, ou même pendant deux à trois mois, selon l'efficacité plus ou moins grande du filtrat inoculé. Cette hypertrophie de la rate ressemble à l'hypertrophie splénique que l'on observe chez les

auteurs étaient imperméables *in vitro* à la toxine tétanique, il est vrai aussi que leur perméabilité a pu être accrue dans certaines limites par diverses conditions qui peuvent se présenter *in vivo*, et par conséquent la protéine animale a pu y pénétrer, ainsi que Sanarelli et Alessandrini l'ont constaté et relaté; au surplus les travaux de Bechhold démontrent cette possibilité.

cobayes inoculés par la voie lympho-ganglionnaire avec le bacille tuberculeux aviaire et sacrifiés après trois à cinq mois d'infection. Son aspect est si typique que son absence doit faire suspecter une préparation défectueuse du filtrat qui ne contenait pas d'éléments filtrables vivants et susceptibles de se multiplier. Parfois, entre les vingtième et quarantième jours après l'inoculation intra-ganglionnaire de filtrats, la surface pleurale du poumon est couverte de rares petits points roses ou rose grisâtres qui simulent l'aspect des tubercules élémentaires produits par le bacille de Koch. Du deuxième au quatrième mois il est fréquent de rencontrer sur la plèvre des épaissements localisés sous forme de petites taches plus ou moins étendues, qui offrent quelquefois l'aspect d'une anthracose limitée et atypique.

Les réactions allergiques que nous avons observées chez les cobayes inoculés avec des filtrats bien préparés, ou chez des cobayes de passage, sont de deux types ; elles n'apparaissent pas avant le vingtième jour et ne se montrent plus après le quatrième mois qui suit l'infection.

a) Chez quelques animaux, l'inoculation intradermique de 0 c. c. 1 de tuberculine au 1/10 donne lieu à une rougeur et à une légère infiltration après vingt-quatre ou même quarante-huit heures. L'intensité de la réaction n'est certainement pas comparable à celle que l'on observe chez les cobayes infectés par le bacille de Koch : elle est surtout constatable par la palpation du trajet inoculé ;

b) Chez la plupart de ces cobayes et chez d'autres à cuti-réactions tuberculiniques négatives, on observe un autre type de réaction allergique qui ne peut être révélé que par l'inoculation intradermique de *filtrats de voiles de cultures en milieu de Sauton*. Celle-ci est caractérisée par la rougeur du trajet inoculé sur un diamètre de 3 à 4 millimètres, rougeur qui est suivie, dans les vingt-quatre heures, de la formation d'une pétéchie avec infiltration minime ou nulle à la palpation et persistante jusqu'au troisième jour. Elle ressemble plus à la réaction de Zinsser qu'à la réaction intradermique à la tuberculine

Les animaux inoculés par n'importe quelle voie présentent tout d'abord un amaigrissement plus ou moins accentué, qui peut persister jusqu'au trentième-quarantième jour, mais qui

ne se termine jamais en cachexie mortelle, précoce ou tardive.

La cachexie peut cependant s'observer soit précocement, soit après trois à six mois, se terminant alors presque toujours par la mort des animaux ; mais elle n'est pas causée par les seuls éléments filtrables du virus tuberculeux : elle est due à la présence concomitante d'une autre infection, — le plus souvent par la bactérie ovoïde (*Pasteurella*) ou par le pneumocoque. Si, en effet, on procède avec soin à l'autopsie de ces animaux cachectiques, on constate qu'ils présentent, à côté des signes manifestes de la maladie qui a causé la mort, quelques foyers bien limités de pneumonie chronique cicatricielle, blanchâtre et atelectasique. Les éléments filtrables du virus tuberculeux ont, dans ces cas, aggravé les effets des infections microbiennes secondaires.

L'opinion de Schmidt (*loc. cit.*) que la cachexie, décrite par quelques chercheurs et due à l'ultravirus tuberculeux, n'existe pas, est exacte pour tout ce qui se rapporte aux cobayes qui n'ont subi que la seule infection par éléments filtrables ; mais elle est erronée en ce qui concerne les cobayes infectés simultanément par l'ultravirus et par certaines autres infections.

Étant donné l'aspect particulier des manifestations morbides chez un animal atteint d'infection mixte, simultanée ou successive, dans laquelle l'un des deux termes du binôme est l'ultravirus tuberculeux, la thèse de Schmidt, à savoir que la cachexie peut être l'expression du passage éventuel à travers la bougie de quelques bacilles vivants, est privée de tout fondement. Schmidt se base sur le fait que, ayant inoculé 2 cobayes avec 1 milliardième de centimètre cube de culture de bacille de Koch, il a observé chez l'un de ces cobayes une cachexie suivie de mort après dix semaines, sans aucune lésion tuberculeuse apparente, mais sûrement causée par le bacille de Koch parce qu'un passage ultérieur déclenchait chez le cobaye une tuberculose typique. Or, dans ce cas, la cachexie était certainement due à un binôme étiologique, dont l'un des termes seulement était l'unité ou les unités de bacilles de Koch inoculées par lui. En effet, dans des recherches et observations en partie inédites, faites en collaboration avec de Sanctis Monaldi, nous avons constaté que des doses même minimales de bacilles de



Koch (0 milligr. 0001) peuvent produire la cachexie sans lésions tuberculeuses apparentes, mortelle en quinze à soixante jours, chaque fois que l'animal est porteur d'une infection latente de pasteurellose ou de pseudo-tuberculose, ou de pneumococcie, que cette infection soit préexistante ou postérieure à l'inoculation de bacille tuberculeux. Cela est dû simplement au fait que, dans le complexe étiologique fourni par une infection chronique et une infection subaiguë, l'infection subaiguë, si elle est prédominante, couvre et masque l'infection chronique. Celle-ci est, par conséquent, modifiée dans son évolution, son aspect anatomique et dans sa symptomatologie. Il faut donc toujours se méfier de la cachexie mortelle chez les cobayes inoculés avec l'ultravirus tuberculeux et rechercher l'autre cause microbienne qui l'a certainement provoquée.

Des lésions identiques à celles produites par les filtrats actifs s'observent chez les cobayes de passage, inoculés par voie ganglionnaire et sous-cutanée, simultanément avec la rate et les ganglions lymphatiques des précédents cobayes. Ces lésions sont plus évidentes et plus étendues, à condition que les passages s'effectuent en sacrifiant les cobayes quinze à quarante jours après le commencement de l'infection par l'ultravirus.

D'après notre expérience, si l'on effectue des passages multiples successifs de cobaye à cobaye à n'importe quel moment de l'infection, avec n'importe quelle technique, avec n'importe quel artifice, avec n'importe quelle dose, on n'arrive jamais à obtenir la tuberculose nodulaire classique en partant de filtrats tuberculeux. La forme de la maladie qui se reproduit est toujours celle précédemment décrite. Dans les cas plus heureux, c'est-à-dire quand les passages successifs s'effectuent tous les vingt à trente jours, on assiste à une aggravation marquée des lésions d'hypertrophie lympho-ganglionnaire et splénique et de tuberculisation initiale apparente du poumon ; mais si l'on conserve ces cobayes en vie pendant quatre à six mois, et qu'on les sacrifie ensuite, on constate que ces signes de l'infection produite par l'ultravirus ont disparu.

En général, l'infection ne se reproduit plus après le troisième ou quatrième passage en série. Et si les passages sont effectués très tardivement, c'est-à-dire après le troisième mois, on n'observe plus rien. Le type particulier de lésions constatables

lors des passages faits en temps voulu, et qui est seulement une accentuation marquée de celui qu'on peut rencontrer chez les cobayes inoculés directement avec les filtrats actifs, peut induire en erreur. C'est ce qui nous est arrivé une fois où nous avons cru assister au retour vers la forme tuberculeuse classique, quoique atténuée, chez des animaux de quatrième passage sacrifiés aux environs du quarantième jour après l'infection. Mais l'autopsie, effectuée quatre et six mois plus tard, des quelques cobayes du même quatrième passage et du même filtrat, qui avaient été laissés en vie, nous fit constater que la forme atténuée de tuberculose classique avait disparu et qu'il subsistait seulement une hypertrophie légère avec augmentation de la consistance, aussi bien de la rate que des ganglions lymphatiques, et épaississements punctiformes foncés du poumon. Que ce type d'infection n'était pas une tuberculose classique évolutive, cela résultait pour nous de la forme anatomique et histologique reproduite par deux cultures réensemencées, obtenues à partir des organes des cobayes de quatrième et de deuxième passage de deux filtrats tuberculeux différents (de type humain et de type bovin).

Ces cultures, dont le développement dans les milieux à l'œuf et à l'asparagine s'est effectué avec beaucoup de difficulté et de lenteur, aussi bien sur le milieu de Sauton que sur pomme de terre glycinée (même actuellement après presque deux ans), présentent les caractères des bacilles tuberculeux type « mammifère », et produisent les mêmes modifications de la réaction en milieux liquides que les types mammifères, bovins et humains.

Ces cultures, inoculées au cobaye par n'importe quelle voie, mais particulièrement par voie lympho-ganglionnaire à la dose de 0,5 à 2 milligrammes, reproduisent, avec une exagération marquée, la forme qui s'observe par inoculation de passage en série de filtrats très actifs. C'est-à-dire qu'on constate une tuberculose évolutive apparente du poumon entre le vingtième et le quarantième jour, de l'hypertrophie marquée de tout le système ganglionnaire qui se prolonge jusqu'au quatrième mois, sans caséification (si l'on excepte les ganglions directement inoculés, dans lesquels on peut noter un petit abcès central qui n'est pas une vraie caséification), de l'hypertrophie

splénique modérée, avec corpuscules de Malpighi bien saillants. Il est difficile d'obtenir de nouveau la culture en partant des organes des cobayes inoculés avec ces souches quand il s'est écoulé deux mois, bien que les bacilles persistent sûrement jusqu'au quatrième mois, parce qu'ils sont décelables en très petit nombre à l'observation directe microscopique du ganglion lymphatique inoculé et même de la rate. Par des passages successifs précoces, on obtient l'extension des lésions décrites (jamais la tuberculose vraie); mais par des passages espacés, de quatre en quatre mois, les lésions deviennent à peine perceptibles. Les cobayes inoculés réagissent nettement et typiquement à la tuberculine au 1/100, avec forte rougeur et infiltration d'un diamètre qui dépasse 1 centimètre et très souvent même avec escarre. L'allergie apparaît vers le quinzième ou vingtième jour et persiste, également intense, jusqu'au quatrième ou sixième mois, puis s'atténue ou disparaît. Des cobayes inoculés par voie sous-cutanée avec 1 à 2 milligrammes de ces cultures, éprouvés deux mois après avec 0 milligr. 0001 de bacilles tuberculeux (souche bovine Vallée), montrent une résistance nette, quoique incomplète, par rapport aux animaux de contrôle inoculés avec la même dose de bacilles de la souche bovine Vallée.

Les modifications histologiques présentées par les cobayes inoculés avec ces cultures par voie lympho-ganglionnaire, étudiées avec beaucoup de soin par Tramontano et encore inédites, révèlent un type particulier de tuberculose avec de nombreuses cellules épithélioïdes et de rares cellules géantes, qui est identique, à partir du deuxième mois, à celui décrit par Banti chez l'homme comme tuberculose fibro-épithélioïde.

Ces modifications histologiques, complètement différentes de celles que produisent les bacilles tuberculeux tués, les bacilles tuberculeux vivants et les bacilles paratuberculeux saprophytes, sont qualitativement identiques à celles que nous avons décrites avec Tramontano pour les filtrats tuberculeux. La différence réside seulement dans l'intensité des lésions.

En effet, chez les cobayes inoculés avec les éléments filtrables du virus tuberculeux nous avons rencontré, avec Tramontano, un tableau histologique qui, de la simple hyperplasie lymphoïde et histiocytaire locale et générale, allait jusqu'à la formation de

rare ou de nombreuses cellules épithélioïdes réunies dans quelques cas, de façon à former des tubercules épithélioïdes circonscrits. Ces modifications, avec maximum d'intensité entre le vingtième et le quarantième jour, et n'ayant pas encore disparu après quatre mois, régressent jusqu'à ne plus former qu'un simple épaississement du tissu collagène dans les cas bénins (c'est-à-dire de simple hyperplasie lymphoïde et histiocytaire), ou bien il se constitue un tissu fibro-épithélioïde dans les cas graves (c'est-à-dire d'hyperplasie avec petits et rares tubercules épithélioïdes). La gravité des lésions n'est pas en rapport avec l'individualité de l'animal, mais avec le filtrat. Les filtrats très actifs donnent naissance, chez tous les cobayes inoculés, à des lésions du type épithélioïde, les filtrats moins actifs à des lésions d'hyperplasie lymphoïde et histiocytaire.

Le syndrome présenté par les cobayes qui ont reçu les filtrats actifs et les modifications histologiques respectives que ces filtrats provoquent ne peuvent pas se confondre avec les effets des produits toxiques contenus dans les filtrats eux-mêmes. Si, en effet, à un lot de cobayes, on inocule par voie sous-cutanée, dans la région de l'aîne, 5 cent. cubes de filtrat préparé avec des organes de cobayes morts de tuberculose aiguë, et à un autre lot de cobayes le même filtrat chauffé à 63° pendant une heure, on constate que seuls les premiers présentent une hypertrophie ganglionnaire évidente à la palpation, sûrement apparente jusqu'au trentième ou quarantième jour, et un amaigrissement sensible ; tandis que les cobayes inoculés avec le même filtrat chauffé à 63° présentent seulement un épaississement des tissus sous-cutanés au niveau de l'inoculation et une légère chute du poids qui ne va pas au delà du douzième jour. Si les animaux des deux lots sont sacrifiés respectivement après huit, quinze, vingt-deux, trente et quarante jours, les différences dans l'hypertrophie ganglionnaire, qui ressortent déjà à la palpation, deviennent encore plus évidentes, de même que devient manifeste la différence dans la coloration et dans l'hyperplasie splénique.

Il ne faut pas croire que l'effet toxique soit notablement atténué parce que la protéine bactérienne a été dénaturée par la chaleur à 63°, car on peut constater des différences analogues si l'on inocule deux lots de cobayes respectivement avec des



filtrats tuberculeux et avec les mêmes filtrats auxquels on a ajouté, vingt-quatre heures auparavant, quelques petits grains d'acide thymique.

Du reste, les filtrats inactifs (qui sont la règle quand on filtre des suspensions de vieilles cultures de souche bovine Vallée), inoculés dans les ganglions lymphatiques cervicaux, ne donnent naissance ni à de l'hypertrophie lympho-ganglionnaire, ni à des modifications de l'aspect extérieur et de la coloration de la rate, qui reste petite et jaunâtre comme chez les sains. Et pourtant ces filtrats ont un coefficient toxique tout au moins égal à celui des filtrats bien préparés, contenant des éléments filtrables vivants et capables de se multiplier.

Enfin, si l'on inocule deux lots de cobayes par voie lympho-ganglionnaire, l'un avec de petites doses d'un filtrat très actif (tel que ceux qui donnent naissance chez les cobayes au tableau histologique lympho-épithélioïde), l'autre avec le même filtrat chauffé à 63°, le tableau histologique, si caractéristique chez les premiers, manque chez les seconds. On constate seulement de l'hyperplasie lymphoïde et histiocytaire modérée des ganglions lymphatiques directement inoculés, qui s'efface complètement après quinze à vingt jours, tandis que la rate, le poumon et les ganglions lymphatiques trachéo-bronchiques ne présentent aucune modification aux examens macro- et microscopiques.

#### QUELLES RELATIONS Y A-T-IL ENTRE L'ULTRAVIRUS TUBERCULEUX ET LE BACILLE DE KOCH?

Rappelons d'abord les deux conceptions, qui s'affrontent jusqu'à présent, relatives aux relations respectives de l'ultravirus et du bacille de Koch dans l'infection tuberculeuse telle qu'elle nous est connue.

La première conception considère l'ultravirus, c'est-à-dire les éléments ultra-microscopiques filtrables vivants, comme un stade de l'évolution du virus tuberculeux, qui donne naissance, dans l'organisme animal, à des bacilles acido-résistants presque dépourvus de propriétés pathogènes. Ceux-ci, à leur tour, par un processus de lente maturation qui s'accomplit dans le même organisme ou mieux dans un autre, reproduisent le bacille de Koch classique.

Que l'élément biologique responsable de l'infection tuberculeuse soit assez volumineux pour être visible au microscope sous la forme du bacille de Koch, ou suffisamment petit pour traverser les filtres de porcelaine poreuse et les membranes de collodion, le mécanisme de l'infection tuberculeuse, comme celui de la guérison naturelle, sont les mêmes tant que les propriétés des deux êtres restent qualitativement identiques; et il en serait ainsi d'après la plupart des auteurs qui ont étudié l'ultravirus tuberculeux.

Malheureusement, presque tout ce qu'on a écrit à ce sujet n'apporte aucune possibilité de comprendre le rôle de cet ultravirus dans la pathogénie des formes si variées de l'infection tuberculeuse.

La thèse qui veut envisager les éléments filtrables comme représentant une phase du cycle évolutif des bacilles tuberculeux est tout artificielle. En effet :

a) Dans les cultures où, pour un nombre énorme de bacilles, les éléments filtrables capables d'évoluer en bacilles de Koch devraient être très nombreux, on n'a jamais obtenu de bacilles acido-résistants *non pathogènes* mélangés avec le vrai bacille de Koch. Il faudrait donc admettre que, dans la culture, le cycle allant de l'ultravirus jusqu'au bacille de Koch est toujours rapidement accompli dans son entier, ce qui est contraire à la réalité.

b) Dans l'organisme des nouveau-nés de mères atteintes de tuberculose évolutive, chez lesquels on constate la présence de bacilles acido-résistants, on n'assiste jamais à l'évolution du cycle jusqu'au bacille de Koch, parce que la tuberculose type Villemin ne se rencontre jamais dans l'hérédotuberculose si le placenta est intact, notion sur laquelle Calmette a toujours insisté.

On pourrait objecter que, pour l'évolution complète des éléments filtrables, il manque quelque substance particulière fournie par le bacille lui-même, mais alors comment s'expliquer que les éléments filtrables, séparés du bacille au moyen des filtres, aient plus de difficultés à évoluer jusqu'au stade de bacilles acido-résistants quand ils proviennent d'une culture que lorsqu'ils proviennent d'un organisme tuberculeux? Il est évident, *a priori*, que, si elle existe, la substance favorable à

l'évolution des éléments filtrables doit être beaucoup plus abondante dans les filtrats de culture que dans les filtrats d'organes qui contiennent infiniment moins de germes microbiens. Et toutes les conditions les plus favorables à l'évolution complète des éléments filtrables ne devraient-elles pas se trouver accumulées plutôt dans l'organisme du fœtus ou dans celui du nouveau-né qui, au contraire, ne fait jamais de tuberculose nodulaire s'il est infecté par le seul ultravirus ayant traversé le placenta?

Si, d'autre part, on se reporte à la conception bactériologique classique du bacille de Koch, on constate qu'elle est décidément insuffisante à expliquer les divers aspects de l'infection et de l'immunité tuberculeuse.

En effet, les deux facteurs essentiels dont dépend l'infection tuberculeuse sont, d'une part, le bacille avec ses exo- et endotoxines, d'autre part l'organisme avec ses défenses humorales et cellulaires. De la succession variée et alternée de ces deux facteurs et de la part prédominante que peut prendre l'un d'eux, dépendent les aspects cliniques de l'infection tuberculeuse et des processus de guérison.

Expérimentalement, par la division transversale du bacille, ou, si l'on veut aussi, par le bourgeonnement des granulations acido-résistantes qui deviennent des bacilles (le résultat final ne change pas), se reproduisent toujours des formes douées de la même fonction, c'est-à-dire de la même virulence intrinsèque et capables de sécréter les mêmes exo- et endo-toxines. L'organisme des animaux sensibles à la tuberculose, — toujours selon la doctrine classique, — n'est pas apte à détruire le bacille ni à produire des substances susceptibles de neutraliser les poisons qu'il élabore. Il est tout au plus capable de l'encapsuler, de l'isoler, et quelquefois de l'éliminer.

Or, ce que nous savons actuellement de l'extrême complexité et de la multiplicité des formes de l'infection tuberculeuse ne cadre plus avec un tel tableau pathologique schématisé et théorique. Les cliniciens se voient obligés d'invoquer l'influence variable du terrain et celle de la constitution pour expliquer les différences, dont la cause leur échappe, dans la sensibilité des divers sujets vis-à-vis d'une même source d'infection, et, de leur côté, les expérimentateurs invoquent

l'influence du nombre et de la virulence, absolue ou relative, des bacilles infectants. Mais ces expédients ne nous apportent aucune solution du problème qui se pose, et qu'il faut résoudre.

Voyons donc si, à la faveur des connaissances récemment acquises, il est possible d'édifier, en face de la conception du cycle évolutif fermé du bacille tuberculeux, passant par une phase invisible et filtrable, une autre hypothèse, exclusivement basée sur les constatations que chacun peut faire, comme nous les avons faites nous-mêmes, et qui soit susceptible d'expliquer d'une manière plus satisfaisante les faits cliniques et expérimentaux que nous observons.

Cette hypothèse, déjà vieille de deux ans, a été formulée par Calmette et développée par son école. Elle est basée principalement sur les travaux de J. Valtis, A. Saenz, Van Deinse et sur les nôtres. C'est assez dire qu'elle répond exactement à ce que nous croyons être la vérité.

La voici, telle que veut bien l'exposer pour nous notre maître lui-même. Nous le remercions de donner ainsi, aux conclusions de ce mémoire, l'appui de son autorité.

*Note de M. le professeur A. Calmette.*

« La survivance de la faculté de reproduire d'emblée le bacille de Koch avec sa virulence initiale, c'est-à-dire avec son aptitude à sécréter ses exo- et endotoxines spécifiques n'existe, croyons-nous, que pour les éléments relativement volumineux, acido-résistants ou non, mais *non filtrables*. Les éléments plus petits, non acido-résistants et *filtrables*, sont de deux sortes : les uns, *capables d'évolution ascendante*, peuvent atteindre la forme bacillaire non acido-résistante, puis acido-résistante, devenir cultivables, le plus souvent seulement en microcolonies sur les milieux artificiels tels que celui de Löwenstein, s'adapter même peu à peu à la vie parasitaire dans les tissus animaux et produire des lésions tuberculeuses.

« Les autres, de plus en plus fragmentés en grains de poussière, non acido-résistants, dont les amas seuls deviennent visibles aux plus forts grossissements du microscope, sont des agrégats de micelles albuminoïdes encore pourvus de spécificité, doués de propriétés toxigènes, mais *incapables d'évolution*



*ascendante*, incapables aussi de s'adapter à la vie parasitaire et voués à la destruction lente ou rapide, soit dans les milieux de culture, soit dans les organismes animaux qui les reçoivent.

« Cette hypothèse de la constitution du virus tuberculeux en deux éléments (forme bacillaire et ultravirus) permet, mieux que toute autre, de comprendre et d'interpréter les faits cliniques et expérimentaux que nous observons quotidiennement.

« Les manifestations de la *granulie tuberculeuse*, par exemple, où les formes bacillaires sont très rarement visibles ou inexistantes, et dont on ne parvenait pas à comprendre la genèse, s'expliquent très simplement par la pullulation rapide, dans tous les viscères de l'organisme, des éléments granuleux non bacillaires, microscopiquement visibles et colorables, acido-résistants ou non, cultivables et réinoculables en séries. Ces éléments granuleux qui produisent la *granulie* sont en général trop volumineux pour passer à travers les bougies filtrantes, de sorte que le filtrat des organes de granuliques, broyés et émulsionnés, ne donne ordinairement pas la granulie, mais renferme en abondance les éléments plus petits, à évolution descendante, qu'on peut retrouver en microcolonies sur les milieux de Löwenstein, mais qu'on ne réussit pas à réensemencer et qui, inoculés, reproduisent seulement la forme atypique, non tuberculeuse, de l'infection par le virus tuberculeux.

« Ces éléments filtrables, non tuberculeux, non cultivables en séries, mais pouvant donner des microcolonies sur le milieu de Löwenstein (A. Saenz), peuvent seuls passer à travers le *placenta intact* chez les femelles gravides (Calmette, Valtis et Lacomme, puis Arloing et Dufourt). Ils possèdent une toxicité propre, — tantôt très grande, et qui paraît affecter, soit presque exclusivement le système nerveux vago-sympathique (d'où les phénomènes de *dénutrition progressive* des nouveau-nés de mères tuberculeuses), soit le système nerveux central (démence précoce?), — tantôt plus faible, s'exerçant localement sur les extrémités terminales nerveuses, dans la peau par exemple, d'où les érythèmes noueux, les sarcoides, tuberculides papulo-nécrotiques, etc. (J. Valtis, P. Ravaut, etc.), ou dans les séreuses articulaires ou autres, et à laquelle se rattachent peut-être

beaucoup de ces formes si variées de localisations que les cliniciens sont tentés d'attribuer à l'infection tuberculeuse, mais où l'on ne trouve de bacilles ni à l'examen direct, ni par l'inoculation aux animaux, ni par la culture.

« Il est certain que, dans le plus grand nombre de ces formes cliniques si diverses de l'infection due au virus tuberculeux, les deux éléments granulaires dérivés du bacille, les *filtrables* et les *non filtrables*, coexistent, associés les uns aux autres, additionnant leurs actions pathogènes propres, et il paraît certain aussi que les caractères particuliers de chacune de ces formes cliniques résultent de la prédominance, de la multiplication plus rapide de l'un ou de l'autre type d'éléments granulaires.

« Nous comprenons, dès lors, pourquoi, lorsque nous expérimentons au laboratoire avec des produits tuberculeux filtrés sur bougies poreuses, nous n'obtenons jamais que des granules filtrables, non tuberculogènes, déterminant ce qu'on a dénommé la tuberculose atypique du cobaye, type Calmette-Valtis, qu'il est seulement possible, par certains artifices tels que les inoculations répétées d'extrait acétonique de bacilles tuberculeux (L. Nègre et J. Valtis) ou par des séries de passages de cobaye à cobaye, de rendre cultivables, adaptables à la vie parasitaire dans l'organisme animal sensible, et transformables peu à peu en éléments granulaires non filtrables, puis en bacilles tuberculeux. (J. Valtis, L. Nègre, A. Boquet, F. Arloing et Dufourt, Em. Sergent, Durand, Kourilsky et Benda, A. Saenz, etc...).

« Et nous comprenons ainsi que, dans les différentes formes cliniques de l'infection tuberculeuse, puissent s'individualiser, comme c'est le cas chez le fœtus ou le nouveau-né de mère tuberculeuse à placenta intact :

« 1° Ce que nous avons appelé les *granulémies prébacillaires*, où l'on ne trouve pas, ou bien où l'on ne découvre que difficilement, des bacilles visibles;

« 2° Les *bacilloses* proprement dites, où les bacilles de Koch se révèlent, — toujours mêlés à un nombre immense de granules acido-résistants ou non, — dans les lésions tuberculeuses circonscrites à un ou plusieurs organes, ou généralisées. »

Telle est l'explication qui nous paraît à la fois la plus rationnelle et la plus féconde de tant de faits d'apparence chaotique

qui s' sont accumulés dans la science depuis que, sous l'impulsion de Calmette, on s'est attaché, dans un grand nombre de laboratoires, à l'étude du virus tuberculeux filtrable. Nous avons longtemps travaillé dans la nuit, n'ayant pas d'autre base de départ que l'expérience de 1910, de Fontès, dont l'exactitude fut mise en doute pendant quinze ans et à laquelle les travaux des premiers expérimentateurs, qui l'avaient reprise et confirmée, n'ont guère ajouté qu'un peu plus de confusion. Ce n'est qu'à présent que nous commençons à percevoir un rayon de lumière. Il nous permet de tirer, de l'ensemble des travaux, y compris les nôtres, que nous avons essayé de synthétiser dans ces pages, les conclusions ci-après.

#### CONCLUSIONS.

Les éléments granulaires, invisibles au microscope, qu'on peut, par filtration à travers les bougies de porcelaine poreuse, séparer des cultures jeunes de bacilles tuberculeux et des organes de sujets tuberculeux, sont des germes *vivants*, susceptibles de se multiplier, de se cultiver *in vivo* et *in vitro*. Leurs effets pathogènes présentent des caractères très particuliers. Ils déterminent chez le cobaye une infection ganglionnaire sans tubercules (tuberculose type Calmette-Valtis). Au cours de cette infection, ils se multiplient dans les organes lymphatiques et donnent naissance à d'autres éléments granulaires (granules à évolution ascendante) qui peuvent devenir acido-résistants et prendre la forme bacillaire typique dont ils dérivent. Ces formes bacillaires ne peuvent pas être confondues avec des bacilles paratuberculeux, ni avec des bacilles morts, ni avec des fragments morts de bacilles de Koch.

Les éléments granulaires séparés par filtration des cultures ou des produits tuberculeux tendent le plus souvent à se désagréger et à disparaître (granules à évolution descendante), aussi bien *in vivo* que dans les microcultures qu'on en obtient sur le milieu de Löwenstein ou dans les milieux liquides (A. Saenz, J. Valtis). Lorsque ces cultures sont jeunes et abondantes, elles possèdent une toxicité à action élective sur les cellules nerveuses. Ces éléments granulaires toxiques, contenus dans les cultures et dans les filtrats de celles-ci ou dans les produits

tuberculeux, passent à travers le placenta intact chez les femelles gravides, et peuvent alors provoquer la mort des fœtus ou les phénomènes de dénutrition progressive des nouveau-nés, si bien étudiés par A. Couvelaire.

Dans d'autres cas, au lieu de produire des accidents mortels, ils peuvent conférer à l'animal, — peut-être aussi au jeune enfant, — une résistance manifeste, mais peu durable, à l'infection tuberculeuse.

Normalement, dans la tuberculose, chez l'animal ou chez l'homme, et aussi au début du développement des cultures en milieux artificiels, à côté des bacilles de Koch et des éléments granulaires acido-résistants ou non acido-résistants qui en dérivent, et qui ne passent pas à travers les bougies de porcelaine poreuse, ni à travers les sacs de collodion, ni à travers le placenta intact, coexistent en plus ou moins grande abondance des éléments granulaires plus petits, filtrables, qui constituent à proprement parler l'*ultravirus*. Dans le mélange, chacun de ces éléments — les non filtrables et les filtrables — conservent leurs caractères spécifiques particuliers et les transmettent à leur descendance. Leur ensemble constitue le *virus tuberculeux* tel que nous le concevons actuellement d'après Calmette. Leur séparation, réalisable par la filtration à travers les bougies poreuses ou à travers le placenta intact des femelles gravides, conduit à l'obtention artificielle ou naturelle de deux types différents d'infection : la *granulémie prébacillaire* et la *bacillose*.

Mais, dans les cultures et dans les organes tuberculeux, les deux éléments coexistent, dérivant l'un de l'autre ; ils accumulent leurs effets pathogènes ou les dissocient, suivant que l'un ou l'autre prédomine. Et c'est là l'explication de l'infinie variété des formes cliniques de la maladie que détermine, chez l'homme et chez les animaux sensibles, le *virus tuberculeux*.

#### NOTES A CONSULTER :

C. NINNI. Ces *Annales*, octobre 1930.

P. VERAN, *La cessation du pneumothorax artificiel. Ses indications. L'avenir des malades*. Ed. Doin et C<sup>ie</sup>. Paris, 1932.

J. C. M. BROEK. *Les granules du virus tuberculeux aviaire*. Drukkeris J. van Boekhoven. Utrecht, 1931.



- L. BALTEANU. A. TOMA et V. BOERIU. *C. R. Soc. Biol.*, **441**, 1932, p. 214.
- G. PETRAGNANI. *Atti del III Congresso Nazionale Italiano di Microbiologia*, 1931, p. 258.
- C. NINNI. *C. R. Ac. des Sciences*, **490**, 1930, p. 597; *Revue de la tuberculose*, n° 5, 1930; *Giornale di Batt. e Imm.*, fasc. 5, 1930.
- T. DE SANCTIS MONALDI. *Revue de la tuberculose*, **11**, 1930, p. 568.
- R. DE BLASIO. *Rinascenza Medica*, **8**, 1931, p. 137.
- N. DE BONIS. *Gazetta intern. di Med. e Chir.*, 30 janvier 1931.
- AUBERTIN et REINES. *C. R. Soc. Biol.*, **406**, p. 1161 et 1163, et **407**, 1931, p. 254 et 350.
- MANFREDI et PARRINO. *Rivista Sanitaria Siciliana*, **49**, n° 4, 1931.
- LANZA. *Boll. Istit. Sier. Milanese*, octobre 1931.
- CUTURI et LANZA. *Riv. di Pat. e Clin. della Tuberculosis*, 5<sup>e</sup> année, fasc. 8, 1931.
- I. FERRANTI. *Boll. Ist. Sier. Milanese*, **9**, 1930, p. 683.
- CALLERIO. *Sanatorium*, avril et juin 1931.
- CAPUANI. *Boll. Ist. Sier. Milanese*, **10**, 1931, p. 345 et 375.
- G. W. SCHMIDT. *Z. f. Hygiene u. Inf.*, **412**, 1931, p. 95 et 113.
- I. OOMEN. *Beschouwingen over en onderzoek autrent Filtreersaar Tuberculose virus*. Ed. Dekker e Van de Vegt. Utrecht. 1932.
- DESSY. *Boll. Ist. Sier. Milanese*, mai 1932.
- G. PETRAGNANI. *Boll. Ist. Sierot. Milanese*, 1931, p. 647.
- C. NINNI. *Ces Annales*, juin 1931 et août 1932.
- C. NINNI. *C. R. Soc. Biol.*, **407**, 1931, p. 615 et 618.
- C. NINNI. *C. R. Soc. Biol.*, **407**, 1931, p. 1046.
- C. NINNI et TRAMONTANO. *C. R. Soc. Biol.*, **409**, 1932, p. 5.
- C. NINNI. *C. R. Soc. Biol.*, **407**, 1931, p. 17.
- C. NINNI. *C. R. Soc. Biol.*, **410**, 1932, p. 169.
- PETRAGNANI. *Boll. Ist. Sierot. Milanese*, 1932.
- B. LANGE. *Beitr. z. Klin. d. Tub.*, **81**, 1932, p. 235.
- NÈGRE et VALTIS. *C. R. Soc. Biol.*, **405**, 1930, p. 183.
- C. NINNI. *C. R. Soc. Biol.*, **410**, 1932, p. 257.
- CALMETTE, VALTIS et LACOMME. *Ces Annales*, **42**, 1928, p. 1149; CALMETTE, VALTIS, NÈGRE et BOQUET. *C. R. Ac. des Sciences*, **181**, 1925, p. 491.
- ARLOING et DUFOUT. *C. R. Ac. des Sciences*, **181**, 1925, p. 826.
- E. SERGENT. *La Presse Médicale*, 18 juillet 1928, p. 590.
- E. SERGENT et KOURILSKY. *La Presse Médicale*, 5 février 1930, p. 187.
- PETRAGNANI. *Ann. d'Igiene*, 1925.
- VERATTI. *Riv. di Pat. e Clin. della Tuberculosis*, **4**, fasc. 8, 1930.
- NATTAN-LARRIER, RAMON et GRASSET. *C. R. Acad. des Sciences*, **183**, 1926, p. 458; *C. R. Soc. Biol.*, **96**, 1927, p. 241.
- NATTAN-LARRIER et RICHARD. *C. R. Soc. Biol.*, **407**, 1931, p. 945.
- BECHHOLD. *Zentr. f. Bakt. Or.*, **412**, 1929.
- NINNI et DE SANCTIS MONALDI. *C. R. Soc. Biol.*, **411**, 1932, p. 261.
- NINNI et TRAMONTANO. *C. R. Soc. Biol.*, **411**, 1932, p. 261.
- CALMETTE. *La Presse Médicale*, 19 mars 1930.
- CALMETTE et VALTIS. *Ces Annales*, **44**, 1930, p. 629.

# **SUR LA VALEUR DES PROCÉDÉS DE LABORATOIRE POUR LE DIAGNOSTIC DE LA LEISHMANIOSE CANINE NATURELLE**

par PAUL GIRAUD et HENRI CABASSU (de Marseille).

Dans l'histoire de la leishmaniose viscérale de l'homme, bien des points sont actuellement élucidés de façon à peu près complète. Seuls, l'épidémiologie, le mode de transmission de l'affection restent encore pleins d'inconnues malgré les très nombreuses recherches faites au cours de ces dernières années. Or, un fait domine ce problème de la transmission : l'existence d'une leishmaniose canine spontanée accompagnant de façon plus ou moins étroite l'endémie humaine. Toute recherche épidémiologique sérieuse doit préciser dans chaque cas particulier l'importance relative de ce facteur canin. Il serait donc essentiel de posséder une méthode sûre et pratique pour dépister la maladie chez le chien. Malheureusement, les divers procédés qui ont été utilisés jusqu'à ce jour sont de valeur très inégale.

*L'examen clinique* permet sans doute, dans les cas avancés, un diagnostic facile de l'affection, mais il est en défaut dans les formes frustes ou latentes, ou dans les cas au début de leur évolution.

De plus, il fait intervenir un facteur personnel qu'il faut autant que possible éliminer dans les recherches de cet ordre.

*Quant aux procédés de laboratoire*, ils sont de deux ordres :

Les uns ont pour but la recherche directe du parasite;

Les autres étudient les modifications sanguines provoquées par la maladie.

Nous allons voir quels sont les avantages respectifs de ces deux groupes de méthodes et leur emploi pour le diagnostic pratique de l'affection.

Notre expérience est basée sur l'observation d'un très grand nombre de cas survenus dans la région marseillaise pendant l'été et l'automne 1932.

Dans tout ce qui va suivre, nous voulons parler de la leishmaniose canine viscérale naturelle accompagnée ou non de lésions cutané-muqueuses, affection chronique et incurable que nous désignons sous le nom de leishmaniose généralisée du chien. Nous n'envisageons pas la leishmaniose cutanée pure et curable analogue au bouton d'Orient de l'homme due à un autre virus, et que nous n'avons jamais observée dans notre région.

#### EXAMEN DE SANG.

C'est une méthode commode ne nécessitant pas le sacrifice de l'animal et permettant facilement les recherches en série.

*L'examen cytologique* ne peut permettre aucune conclusion ferme. Sans doute, trouve-t-on souvent comme chez l'homme la triade hématologique de la leishmaniose viscérale : anémie, leucopénie, mononucléose. Mais, d'une part, cette formule peut manquer souvent chez le chien dans les cas de leishmaniose avérée ; d'autre part, elle peut se rencontrer dans un grand nombre d'autres affections chroniques. Elle n'est donc ni constante, ni spécifique.

*L'examen biologique*, au contraire, permet de retrouver en cas de leishmaniose canine deux réactions de grande valeur : la formol-réaction et l'uréastibamine-réaction, ou réaction de Chopra et Gupta.

*L'uréastibamine-réaction*, dans les quelques cas où nous l'avons pratiquée, nous a paru assez sensible et d'une grande fidélité, mais elle est d'une technique un peu délicate, et l'uréastibamine est un médicament qu'il est encore très difficile de trouver en France. Nous nous réservons d'ailleurs de revenir sur cette recherche dans un travail ultérieur.

La technique de cette réaction est la suivante : mettre dans deux tubes à hémolyse, dans l'un du sérum pur, dans l'autre du sérum dilué au 1/10. Faire couler lentement quelques gouttes d'uréastibamine en solution à 4 p. 100 fraîchement préparée.

La présence d'un précipité net à la surface de séparation des deux liquides dans le tube où le sérum a été dilué au 1/10 indique une réaction positive. Il sera bon de faire deux tubes témoins pour le cas où la réaction ne serait pas intense.

Certains auteurs substituent le néostibosane à l'uréastibamine avec, semble-t-il, des résultats comparables.

**FORMOL-RÉACTION.** — La formol-réaction est, au contraire de la précédente, d'une extrême simplicité, et il suffit d'une personne un peu minutieuse pour en observer correctement les résultats. Elle serait donc très précieuse si l'on pouvait lui accorder une valeur diagnostique réelle. Or, si l'on se rapporte à tout ce qui a été publié à son sujet, on voit que les divergences sont très grandes suivant les auteurs.

Nous avons donc voulu reprendre cette question sans idée préconçue.

Il nous a paru extrêmement important de préciser la technique de la réaction et la façon d'en noter les résultats, car il ne semble pas que l'on se soit toujours bien entendu à ce sujet.

*Technique de la réaction.* — Il suffit de se procurer :

*Deux tubes à hémolyse.*

*Du formol* de commerce filtré titrant 40 p. 100 d'aldéhyde formique environ.

*Du sérum* de chien à éprouver. Ce sérum doit être prélevé à jeun si possible, en tout cas, loin d'un repas pour éviter la lactescence post-prandiale, seul obstacle sérieux à la bonne lecture de la réaction. Un léger degré d'hémolyse souvent difficile à éviter chez le chien ne gêne pas notablement l'observation.

Il suffit alors de mettre dans chaque tube 1 cent. cube de sérum et d'ajouter dans l'un d'eux 1 goutte de formol en mélangeant aussitôt; le second tube sert de témoin.

*Lecture des résultats.* — On observe les résultats de minute en minute pendant cinq minutes, puis de cinq en cinq minutes pendant une heure; enfin, au bout de six, douze et vingt-quatre heures.

Dans le cas de réaction positive, on observe les phénomènes suivants :

*La gélification* se produit rapidement : le sérum devient d'abord visqueux, puis se prend en masse de telle sorte que l'on peut renverser le tube sans qu'il se produise de déformation.



L'opacification débute, en général, en même temps que la gélification, mais elle en est indépendante, et ne dépend vraisemblablement pas des mêmes modifications physico-chimiques. En effet, on peut observer souvent la gélification sans opacification, mais nous n'avons jamais observé le phénomène inverse opacification sans gélification.

Cette opacification consiste en un trouble, une lactescence parfois très intense du sérum qui s'accroît en général dans les heures qui suivent le début de la réaction.

Une notion d'une importance extrême doit être soulignée ici parce qu'il ne semble pas qu'on lui ait accordé toujours toute sa valeur et que nous pensons y trouver la raison des divergences signalées plus haut.

Il est bien entendu que, comme en médecine humaine, la simple gélification ou réaction de Gaté et Papacostas n'a aucune valeur pratique et se rencontre au cours des affections les plus variées. Seule la réaction complète, gélification avec opacification, doit être retenue comme ayant une importance pour le diagnostic des leishmanioses.

Quant à la rapidité de la réaction, nous ne lui accordons pas une très grande signification. Nous notons cependant nos résultats de la façon suivante :

Réaction *nettement positive* : celle qui se produit dans la première heure ;

Réaction *retardée*, mais positive encore : celle qui se produit dans les six premières heures ;

Réaction *douteuse* : celle qui se produit dans les vingt-quatre heures.

*Valeur diagnostique.*

Les choses étant ainsi bien précisées, voyons l'importance pratique de cette *formol-gélopacification* pour le diagnostic de la leishmaniose canine.

Si nous compulsions les résultats de nos recherches, nous trouvons les résultats suivants :

Dans les 17 cas où nous avons pu mettre en évidence le parasite et où par conséquent la leishmaniose est certaine, la formol-réaction a toujours été positive en moins d'une heure.

Dans 9 cas dont le diagnostic avait été posé avec les seules ressources de la clinique, mais qui avaient été améliorés par le

traitement stibié, la réaction a été sept fois positive en moins de vingt-cinq minutes et deux fois en moins de deux heures.

Dans 16 cas où le diagnostic était hésitant, nous avons eu 12 formol-réactions négatives et 4 formol-réactions positives, en moins de deux heures.

Dans ces 4 derniers cas, les parasites avaient été recherchés soit dans des ganglions, soit dans le foie, soit par trépanation d'un os long. Mais ces explorations faites sur l'animal vivant n'ont pas la rigueur des recherches faites après autopsie, ainsi que nous le verrons tout à l'heure.

Enfin pratiquée chez 17 chiens sains en apparence, ou atteints d'une autre affection, la formol-réaction a été positive deux fois et négative quinze fois. Ces deux cas ne doivent cependant pas être retenus à l'encontre de la réaction, les parasites n'ayant pu être recherchés après sacrifice de l'animal.

Elle a été positive chez un chien atteint de filariose et non suspect de leishmaniose.

Nous citerons pour terminer deux cas particuliers qui nous paraissent très instructifs.

Dans le premier, il s'agissait d'un chien très suspect de leishmaniose de par ses lésions cutanées; or, à notre grande surprise, la formol-réaction fut négative. La recherche du parasite faite dans les ulcérations cutanées, puis après autopsie dans la rate, le foie et la moelle osseuse, fut négative: la formol-réaction avait réformé le diagnostic clinique.

Dans un second cas à l'inverse, il s'agissait d'un chien ayant vécu au contact d'un enfant atteint de Kala azar, mais paraissant en excellente santé sans aucun signe clinique suspect. Or, la formol-réaction fut positive, l'autopsie de l'animal permit de retrouver des leishmania surtout abondants dans la moelle osseuse. Là encore, la réaction permit de suspecter la maladie qu'aucun signe clinique n'extériorisait.

Nous pouvons donc dire avec certitude que la formol-réaction a été positive :

Dans tous les cas avec confirmation parasitologique;

Dans tous les cas où le traitement a amélioré l'animal;

Dans tous les cas où les signes cliniques permettaient de porter le diagnostic de leishmaniose;

Dans deux cas, elle nous a permis de réformer le diagnostic

clinique soit dans le sens de la leishmaniose, soit à l'encontre de ce diagnostic.

*La formol-réaction est donc presque toujours positive au cours de la leishmaniose chronique du chien.*

Est-elle aussi spécifique ? Il semble d'après les résultats que nous venons d'exposer que sa spécificité ne soit pas absolue, puisqu'elle a été positive dans un cas de filariose. Mais dans l'ensemble elle a toujours été négative dans les cas où l'autopsie a permis de vérifier l'absence de parasites. Les autres cas où elle a été positive sans que l'on ait pu rechercher les leishmania ne peuvent lui être opposés, puisqu'il existe des formes absolument latentes de la maladie.

*La réaction possède donc une spécificité suffisante pour qu'on lui accorde une grande valeur.* Peut-être est-elle aussi positive dans d'autres parasitoses (filariose, par exemple), mais cela restreint déjà le cercle des investigations. Elle a été négative dans les cas de maladies infectieuses chroniques telles que la tuberculose.

D'ailleurs ces résultats auxquels nous sommes arrivés chez le chien concordent parfaitement avec les recherches qui ont déjà été faites et que nous poursuivons encore chez l'homme.

Comment les accorder avec d'autres travaux et en particulier avec ceux de Velu, Eyraud et Petitdidier, qui concluent, à la suite de recherches entreprises sur 280 chiens examinés au Maroc, à la non-spécificité et au peu de valeur de la réaction ? Nous pensons que ces auteurs ont dû observer dans un milieu où les chiens n'étaient pas contaminés et qu'ils se sont contentés, pour déclarer leur réaction positive, de la gélification qui est en effet non spécifique et de peu de valeur.

Nous continuons donc à penser que la formol-gélopacification est une réaction très précieuse par sa simplicité, et que si ses résultats ne sont pas absolus ils présentent une constance et une spécificité suffisante pour orienter le diagnostic et inciter ou non à poursuivre la recherche du parasite, seul signe de certitude de l'affection.

#### RECHERCHE DES PARASITES.

La recherche des parasites dans la leishmaniose canine n'est pas aussi facile qu'on pourrait le croire au premier abord, et si

l'on ne procède pas avec une grande minutie et avec une technique bien réglée, des cas authentiques de la maladie peuvent fort bien passer inaperçus. Cela nous est arrivé à nous-mêmes au début de nos travaux et peut-être faut-il trouver là l'explication de certains résultats négatifs un peu surprenants en apparence.

Une constatation préalable permettra d'orienter le problème et de permettre de comprendre certains succès.

Dans la leishmaniose généralisée que nous avons en vue, les parasites sont présents: parfois dans la peau et sur la muqueuse buccale, au niveau des ulcérations surtout, et alors ils peuvent être en très grand nombre.

**Examen des frottis et résultats.**

Voici résumés dans ce tableau les résultats de nos examens parasitologiques :

	XXXIII	XXV	XXVI	XXVII	XXX	XXXI	XXXVII	XXXIX	XXXXI	XXXV	LII	LIV
Du vivant de l'animal :												
Foie . . . . .	+	+	+	+	0	0	0	+	0	0	0	0
Ganglions . . . .			+				++			0		
Moelle osseuse . .								0		+	0	
Ulcère buccal . . .			++		+++	+++			+++			+
Ulcère cutané . . .	+	+++				+++	0				+	+
Peau . . . . .							0					
	V	XIII	XXVII	XXIX	XXXIII	XXXIX	XXXXI	XXXXV	LII	LVIII	LXIX	
A l'autopsie :												
Foie . . . . .	0	0	+	+	+	0	+	+++	0	+++	0	
Rate . . . . .	+	+	0	+++	+++	+++	+	+++	0	+++	+	
Moelle osseuse . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	
Ganglions . . . .				+++	+++	0	++	0		0		
Rein . . . . .								+++		+++	0	
Peau . . . . .				+++				+++		+++		
+, quelques rares parasites; ++, parasites en assez grand nombre; +++, grand nombre de parasites; 0, pas de parasites vus.												



Au niveau des organes internes, nous les avons retrouvés par ordre de fréquence :

Dans la moelle osseuse d'abord, et surtout la moelle rouge de l'extrémité antérieure d'une côte.

Dans la rate ensuite, mais en beaucoup moins grande abondance.

Dans le foie enfin, qui en contient toujours beaucoup moins que la moelle osseuse et souvent moins que la rate.

Les parasites sont très rares ou absents dans les ganglions ; accessoirement, nous avons pu en retrouver dans le rein.

Un tableau que nous publions ci-dessus objective bien ces diverses constatations. Mais nous ferons remarquer surtout que le foie, qui est toujours très parasité dans la leishmaniose expérimentale conférée par voie hépatique ou péritonéale, ne l'est que très peu ou pas dans la leishmaniose naturelle.

Voyons maintenant comment le problème se pose suivant que l'animal est vivant ou que l'on a pu le sacrifier.

CHEZ L'ANIMAL VIVANT. — La recherche des parasites doit se faire dans la peau d'abord, ensuite dans le foie, la rate, les ganglions, la moelle osseuse, enfin dans le sang.

*La recherche des parasites dans la peau* est facile s'il existe des ulcérations cutanées ou muqueuses, sur lesquelles nous avons récemment attiré l'attention. Il faut cependant savoir que les parasites se trouvent dans le fond de l'ulcère ou sur ses bords et non pas dans la sécrétion purulente qui ne contient que des germes de surinfection. Il faut donc racler le fond ou les bords de l'ulcère après l'avoir détergé, mais sans trop faire saigner cependant.

S'il n'existe pas d'ulcération, on peut rechercher les leishmania dans la sérosité de raclage d'une région atteinte de dermatite purpuracée ; mais, dans ce cas, les résultats sont très inconstants et les parasites plus rares. *La ponction d'un ganglion* correspondant aux lésions cutanées et tuméfiées nous a donné par deux fois un résultat positif, mais aussi de très nombreux mécomptes.

*La ponction du foie* se fait facilement suivant la technique décrite par C. Nicolle : ponction dans la région dorsale droite, dixième espace intercostal, à deux travers de doigt des apo-

physes épineuses. L'aiguille doit être assez longue : 8 à 10 centimètres. On l'enfoncera perpendiculairement au thorax, mais pas jusqu'à la garde.

On aspire très légèrement et on retire en obturant l'orifice externe de l'aiguille. Il ne reste plus qu'à refouler le contenu sur une lame de verre. Cette petite opération est assez facile et ne paraît pas incommoder beaucoup l'animal. Mais les résultats sont très inconstants et nous ne comptons plus les ponctions négatives chez le chien, alors que l'autopsie ultérieure démontra l'infection très marquée de la moelle osseuse. La ponction du foie est donc très infidèle dans la leishmaniose naturelle.

*La ponction de la rate* a toujours passé pour difficile chez le chien dont la rate longue et mobile n'atteint jamais le degré d'hypertrophie qu'elle présente chez l'homme. Aussi est-elle peu conseillée jusqu'à présent. Cependant, Balozet a fait connaître une technique de ponction de la rate qu'il prétend assez sûre.

Le chien est couché en position ventrale. Ponctionner à l'intersection du bord postérieur de la dernière côte et d'un plan horizontal passant par le milieu de la hauteur du thorax. L'aiguille doit être dirigée perpendiculairement ou très légèrement inclinée en bas et en avant.

Nous nous sommes livrés à quelques essais sur des chiens sacrifiés et cette technique nous a paru ne pas conduire sur la rate à tout coup. Enfin, l'infection de la rate, généralement plus importante que celle du foie, est cependant bien moindre que celle de la moelle osseuse. Mentionnons que Adler fait une biopsie de la rate après laparotomie sous anesthésie. Le procédé est sans doute élégant, mais paraît bien peu pratique et en tous cas impossible dans des recherches faites en série.

*La trépano-ponction d'un os long* est un procédé qui est assez sûr et facile à pratiquer. Mais il est assez douloureux pour l'animal et il est rare qu'un propriétaire consente à son exécution s'il n'est pas décidé à sacrifier l'animal. D'ailleurs, dans nos recherches sur la localisation des parasites, nous les avons toujours trouvés plus abondants dans la moelle rouge d'une côte (extrémité antérieure) que dans la moelle moins active d'un os long.

*La recherche du parasite dans le sang après triple centrifu-*

gation comme l'a fait Nicolle ou par culture sur milieu NNN, est un procédé long et délicat ; de plus, il est très infidèle et peut donner des résultats négatifs chez des animaux sûrement infectés. Nous ne pensons pas que l'on puisse le retenir pour le diagnostic pratique de la leishmaniose canine.

A L'AUTOPSIE. — Les leishmanies peuvent plus facilement être mises en évidence.

Cependant notre expérience nous montre qu'il ne faut pas se borner à faire des frottis de foie et de rate, car, dans ces conditions, les recherches peuvent être longues ou même donner des résultats douteux ou négatifs alors que l'infection est certaine.

Cependant, dans la grande majorité des cas, la recherche des leishmanies dans le foie et la rate donne des résultats positifs.

Les frottis de moelle rouge des os sont toujours, d'après notre expérience, les plus riches en parasites, et il ne faudra pas négliger de les faire si l'on veut arriver rapidement au diagnostic. Dans tous les cas, où l'animal était infecté, nous avons ainsi, par un examen rapide des frottis de côte, retrouvé des parasites en grand nombre alors que nous avons passé plusieurs heures pour en trouver quelques-uns sur les frottis de foie ou de rate.

Nous prélevons toujours un fragment de la moelle rouge d'une côte un peu avant son union avec le cartilage costal. C'est un os facile à sectionner même aux ciseaux et qu'il est facile de dénuder rapidement au cours de toute autopsie.

Nous dirons donc en conclusion que la recherche des leishmanies doit se faire sur le vivant dans les ulcérations cutanées ou muqueuses s'il en existe ; sinon, et en cas d'insuccès, par trépano-ponction d'un os long ou biopsie d'un fragment de côte.

Chez le cadavre, on s'adressera aux frottis de moelle osseuse (côte) et accessoirement de foie et de rate. Cette recherche sur le cadavre peut se faire même longtemps après la mort et nous avons eu des parasites typiques dans des organes en pleine putréfaction.

Par contre, *un traitement stibié même discret fait disparaître très rapidement les parasites de tous les organes internes, plus*

lentement dans les ulcérations. Il importe de connaître cette cause d'erreur pour ne pas infirmer un diagnostic de leishmaniose si un traitement par l'antimoine a été institué préalablement à la recherche des parasites.

Or, justement dans ces cas traités, la formol-réaction reste positive et pourra servir à la confirmation du diagnostic, alors même que les signes cliniques se sont atténués et que les parasites ne peuvent plus être mis en évidence. *La formol-gélopacification doit donc prendre rang à côté de l'examen clinique et de la recherche des parasites dans le dépistage pratique de la leishmaniose canine.* Ses résultats n'entraînent pas des conclusions formelles, mais apportent un élément non douteux de probabilité.

Nous espérons que cette mise au point sera utile aux chercheurs qui s'intéressent à cette question, qu'elle évitera les tâtonnements du début, facteurs d'incertitude et de découragement, et enfin qu'elle permettra de faire avancer nos connaissances au sujet de l'étiologie de la leishmaniose humaine (1).

(1) Pour la bibliographie et le détail des observations, nous renvoyons à la thèse de l'un de nous (Cabassu, *Thèse vétérinaire*. Paris, 1933).



# RECHERCHES SUR LA NUTRITION DE QUELQUES EUGLÈNES

## I — *EUGLENA GRACILIS* (1)

par HISATAKE DUSI.

(Laboratoire de Protistologie de l'Institut Pasteur.)

### Introduction.

Le groupe des Euglènes a depuis longtemps attiré l'attention des biologistes. Apparenté incontestablement aux végétaux par l'appareil chlorophyllien (plaste et chlorophylle) que possèdent beaucoup d'espèces d'Euglènes, il présente, d'autre part, des affinités animales certaines, si l'on considère que certaines espèces du genre *Euglena* même et des familles voisines entières (*Astasidæ*, *Peranemidæ*) sont dépourvues de chlorophylle. Il serait oiseux de discuter si les Euglènes sont des animaux ou des végétaux. Au point de vue morphologique, les Euglènes blanches, animales, ne diffèrent des formes à affinité végétale que par l'absence de chlorophylle et les formes blanches dérivent des formes vertes.

Nous avons donc pensé que l'étude physiologique de la nutrition de quelques espèces d'Euglènes pourrait nous apporter des résultats intéressants.

Klebs (1883), qui trouvait l'étude morphologique insuffisante pour la détermination des espèces, avait émis l'idée que la culture prolongée des organismes pourrait donner des renseignements intéressants. Dangeard (1901) arrive à une conclusion analogue.

C'est de 1899 que date le mémoire de Zumstein, le premier auteur qui ait réalisé une culture bactériologiquement pure

(1) A l'impression, pour paraître prochainement dans ces mêmes *Annales* : II. *Euglena stellata*, *klebsii*, *anabaena*, *deses*, *pisciformis* et Remarques générales.

d'une Euglène : *Euglena gracilis*. Zumstein montra en particulier qu'*Euglena gracilis* peut se multiplier à l'obscurité dans un milieu peptoné et qu'elle se décolore en l'absence de lumière. Ce travail fondamental ne fut repris qu'en 1912, simultanément par Ternetz et par E. G. Pringsheim, qui montrèrent qu'*Euglena gracilis*, qui, nous l'avons vu, peut se nourrir de substances organiques complexes, peut se multiplier aussi à la lumière aux dépens de milieux purement minéraux (Autotrophie).

Les recherches sur la physiologie des Euglènes ne devaient être reprises qu'en 1924 par F. Mainx, qui réussit à isoler, en culture bactériologiquement pure, douze espèces du genre *Euglena* et encore trois espèces des autres genres eugléniens et consacra deux importants mémoires (1928) à l'étude de leur nutrition.

Nous ne citerons pas ici les quelques auteurs comme Khawkin (1885-1886), Thornton et Smith (1915), Linsbaver (1915), Turner (1917), Tannreuther (1923), etc., qui ont étudié la nutrition des Euglènes en culture bactériologiquement impure. Un historique détaillé sera d'ailleurs donné dans les chapitres relatifs à chacune des espèces.

Il est inutile d'insister ici sur la nécessité de n'entreprendre des travaux de physiologie microbienne qu'avec des cultures bactériologiquement pures. La première condition à réaliser pour une telle étude physiologique est l'obtention d'un milieu de culture, le plus simple possible, synthétique si possible. Nous nous sommes donc attaché à déterminer « le pouvoir de synthèse » de quelques Euglènes, c'est-à-dire, suivant A. Lwoff, à déterminer la nature des composés azotés les plus simples nécessaires à leur croissance et leur multiplication indéfinie.

Il va sans dire que, dans ces recherches sur la nutrition, les problèmes doivent être abordés du point de vue qualitatif. Malgré l'intérêt considérable que présentera l'étude énergétique comparée de la nutrition des diverses Euglènes, nous avons laissé cette question systématiquement de côté.

Les questions que nous nous sommes posées et qui seront étudiées dans ce travail sont les suivantes :

1° Quelles sont les substances nécessaires aux Euglènes pour faire la synthèse de leurs constituants?

2° Y a-t-il pour chaque espèce d'Euglènes un comportement spécifique au point de vue physiologique?

3° Quelle est la situation du genre *Euglena*, parmi les protistes Eucaryotes (au sens de Chatton, 1923, c'est-à-dire, pourvus d'un noyau morphologiquement défini), au point de vue du pouvoir de synthèse?

Ces travaux ont pu être effectués grâce au professeur E. G. Pringsheim, directeur du Pflanzenphysiologisches Institut de l'Université allemande de Prague et au Dr Félix Mainx, qui ont réalisé une collection de cultures bactériologiquement pures des protistes à chlorophylle, cultures dont ils ont bien voulu, très libéralement, nous confier quelques échantillons. Ce travail a été commencé au laboratoire d'Évolution des êtres organisés de la Sorbonne. J'adresse mes remerciements au professeur Caullery, qui a bien voulu m'y accueillir. Mes recherches ont ensuite été poursuivies pendant près de quatre ans au laboratoire de Protistologie de l'Institut Pasteur où j'ai reçu du professeur F. Mesnil la plus large hospitalité. J'ai été initié aux méthodes bactériologiques appliquées aux cultures pures de protozoaires, par le Dr André Lwoff, chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur. J'ai profité de son expérience des problèmes relatifs à la nutrition des protozoaires. Il m'a guidé de ses conseils et a bien voulu revoir la rédaction de ce mémoire. Je suis heureux de trouver ici l'occasion de lui exprimer ma reconnaissance.

### Méthodes.

**MATÉRIEL.** — Nous avons dit que nous avons reçu nos souches du Pflanzenphysiologisches Institut de l'Université allemande de Prague. Toutes ces souches étaient bactériologiquement pures. Nous nous en sommes assuré par les épreuves habituelles. Nous avons pratiqué lesensemencements dans les milieux indiqués par A. Lwoff (1932).

D'une manière générale, pour les vérifications de souches et pour l'ensemencement, nous avons suivi les techniques indiquées par cet auteur, telles qu'elles sont employées au laboratoire de Protistologie de l'Institut Pasteur.

Toutes les cultures étudiées sont des cultures obtenues à partir d'un seul individu (communication orale du professeur E. G. Pringsheim).

MILIEUX. — Toutes nos expériences ont été faites dans des tubes en verre pyrex. A. Berthelot (1926) a montré l'importance de l'utilisation de verres du type pyrex pour les cultures en milieu synthétique.

Pour tous les milieux synthétiques, nous avons employé de l'eau bi-distillée dans un appareil de verre pyrex.

Pour les milieux, il a été tenu compte de l'équilibre ionique et la concentration totale en sels a été envisagée afin d'obtenir les formules convenables (voir Küster 1921, Bělař 1928, Kufferrath 1930). Les formules seront données dans les chapitres spéciaux.

Les produits chimiques que nous avons utilisés ont été des produits des maisons Hoffmann La Roche, Poulenc et Vaillant, les plus purs possibles.

Le volume du milieu ne joue qu'un rôle insignifiant pour nos recherches. D'ailleurs, d'après Jahn (1929), il n'y a pas pour *Euglena sp.* d'effet « allélocatalytique » de Robertson. Toutes nos expériences ont été faites dans des tubes à essai de 15 à 16 millimètres de diamètre renfermant 10 à 12 cent. cubes de milieu.

D'autre part, la question de la réaction du milieu a fait l'objet d'études très attentives. Depuis Pasteur, on connaît l'importance considérable de ce facteur pour les cultures de micro-organismes. La question de la réaction du milieu a fait de nombreux progrès, surtout depuis que la notation en  $pH$  a été adoptée. Pour les Euglènes, le  $pH$  des milieux n'avait, avant nos premiers travaux (1930 *a*), jamais été déterminé, les auteurs s'étant contentés d'y ajouter une quantité donnée de base ou d'acide. Le  $pH$  du milieu varie naturellement suivant le pouvoir de tampon de ses substances constitutives. Nous avons donc eu soin de déterminer les  $pH$  limites et le  $pH$  optimum, dans un milieu peptoné, pour chaque espèce étudiée (méthode colorimétrique suivant Clark, 1928; détermination à 0,2 près). Le  $pH$  du milieu était ajusté avant stérilisation, vérifié avant l'ensemencement et suivi au cours du développement des cultures.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES. — Les cultures étaient exposées à la lumière naturelle diffuse, à une fenêtre nord, à la tempéra-



ture du laboratoire. Des essais préliminaires nous ont montré que ces conditions conviennent parfaitement à nos recherches.

Les repiquages étaient pratiqués avec toutes les précautions habituelles. Des tubes d'épreuve, bouillon, gélose, étaient commencés à chaque repiquage, précaution indispensable surtout lorsqu'on étudie des milieux liquides minéraux où le développement bactérien peut facilement passer inaperçu.

Pour étudier la valeur d'un milieu déterminé, on effectuait toujours plusieurs repiquages en série (quatre en général), afin que les résultats ne fussent pas faussés par l'apport de substances étrangères. C'est là une précaution élémentaire dont l'importance a semblé échapper à beaucoup d'auteurs.

Lorsqu'on ensemait un organisme dans un milieu à étudier (ensemencement à la pipette), on ensemait toujours un tube de milieu d'entretien reconnu favorable culture témoin).

D'autre part, on étudie toujours simultanément la valeur nutritive d'un milieu pour plusieurs espèces, soit d'Euglènes, soit d'autres organismes (cultures en milieux témoins).

Toutes les expériences ont été répétées. Il s'agit naturellement de séries d'expériences; à chaque repiquage, nous commençons toujours plusieurs tubes du même milieu (cultures parallèles).

Les expériences à résultats négatifs ont été répétées plusieurs fois afin d'éviter toute cause d'erreurs.

Les cultures ont été examinées très fréquemment, tous les jours ou tous les deux jours au début du développement, une fois par semaine par la suite. L'examen a été prolongé longtemps, jusqu'à décroissance et souvent mort de la culture.

Les cultures ont été examinées *in toto* au microscope et des numérations de la densité des flagellés par millimètre cube de culture ont été effectuées.

#### Recherches préliminaires — Milieux d'entretien.

DÉFINITION MORPHOLOGIQUE. — *Euglena gracilis* a été décrite par Klebs en 1883.

Elle a fait l'objet d'un certain nombre d'études morphologiques. Klebs 1883, Zumstein 1899, Dangeard 1901, Ternetz 1912, Pringsheim 1913, Mainx 1924-1926-1928, etc. . et nous croyons tout à fait inutile de revenir ici sur la diagnose de cette forme.

CULTURE PURE D'EUGLENA GRACILIS. — *Euglena gracilis* a été étudiée par de très nombreux auteurs. Peu d'entre eux ont travaillé avec des cultures bactériologiquement pures : ce sont Zumstein 1899, Ternetz 1912, et surtout Pringsheim 1913 et Mainx 1924-1928. Nous reviendrons sur ces travaux dans les chapitres spéciaux à propos de chaque sujet traité.

SOUCHE. — Nous avons étudié une souche d'*Euglena gracilis* Klebs provenant des collections du Pflanzenphysiologisches Institut de l'Université allemande de Prague. Au début de nos recherches, nous avons réalisé une culture à partir d'un seul flagellé isolé de la culture de Prague (ignorant que Mainx l'avait déjà fait). Toutes nos expériences ont été effectuées avec cette culture.

MILIEUX. — Nos premiers repiquages ont été effectués dans un milieu dérivé du milieu de Detmer : le nitrate de calcium était remplacé par une peptone pancréatique de muscle (digestion très poussée) [peptone M. B. T. A. de Vaillant et C<sup>o</sup>, Paris].

Peptone . . . . .	2,0
SO <sub>4</sub> Mg . . . . .	0,20
PO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> . . . . .	0,20
KCl . . . . .	0,20
Fe <sub>2</sub> Cl <sub>6</sub> . . . . .	0,0025
Eau distillée . . . . .	1.000
NaOH, q. s. pour pH . . . . .	7,0

Ce milieu a permis d'excellentes cultures d'*Euglena gracilis*. Plus tard, la peptone M. B. T. A. a été remplacée par la peptone 5 C de Vaillant, laquelle est une peptone pancréatique de muscle ayant subi une hydrolyse peu poussée.

Il nous est apparu ensuite que la peptone contenait tous les

éléments nécessaires à la nutrition d'*Euglena gracilis* et nous avons utilisé alors tout simplement de l'eau peptonée :

Peptone . . . . .	2, 4 ou 10 grammes.
Eau distillée . . . . .	1.000
NaOH, q. s. pour pH . . . . .	7,0

Dans l'eau peptonée à 10 p. 1.000, le développement est plus abondant que dans l'eau peptonée à 2 ou 4 p. 1.000, mais les cultures périssent plus rapidement. Pour l'entretien des souches, il est donc préférable d'employer, et nous avons utilisé, de l'eau peptonée à 4 p. 1.000.

ÉPREUVES DE PURETÉ BACTÉRIOLOGIQUE. — La souche de Prague qui nous a été envoyée était bactériologiquement pure. Nous nous en sommes assuré dès sa réception en janvier 1929.

Depuis cette date, nous avons pratiqué fréquemment des ensemencements bactériologiques. D'autre part, à chaque repiquage ou à chaque expérience, nous avons ensemencé un tube de gélose au bouillon peptoné et un tube de gélose de Sabouraud.

L'examen des milieux d'épreuve, l'examen microscopique des cultures n'ont jamais montré de bactéries. Nous avons eu de très rares contaminations par les moisissures. Les tubes contaminés ont naturellement été éliminés. Ces contaminations ont été tout à fait exceptionnelles.

CONDITIONS GÉNÉRALES. — La souche d'*Euglena gracilis* a été entretenue à la lumière (exposition au nord), à la température du laboratoire. Le développement des cultures est naturellement plus lent en hiver qu'en été, tant à cause de la température que de la lumière.

NUMÉRATION DES FLAGELLÉS. — Nous avons compté les flagellés avec un hématimètre. Pour nous :

	FLAGELLÉS par millimètre cube
Très bonne culture correspond à une densité de . .	400 à 450
Bonne culture. . . . .	40 à 100
Culture pauvre . . . . .	4 à 40
Culture très pauvre . . . . .	moins de 4

## Réaction du milieu.

### HISTORIQUE.

Il était de toute première importance, avant d'entreprendre des recherches sur la valeur alimentaire de telle ou telle substance, de connaître le  $pH$  du milieu permettant un développement optimum. L'ensemble des données historiques conduisait à penser qu'un milieu acide était plus favorable qu'un milieu alcalin.

Zumstein (1899) remarque pour la première fois la résistance très particulière d'*Euglena gracilis* à l'acide citrique.

En milieu peptoné ou en infusion de foin, l'acide citrique à la concentration de 0,5 à 2 p. 100 n'exerce pas d'action nocive.

L'acide citrique à 5 ou 6 p. 100 est nettement défavorable; seuls de rares flagellés sont vivants au dix-septième jour dans un milieu aussi acide. Si l'acide est à 10 ou 20 p. 100, les flagellés sont tués rapidement.

D'après Zumstein, les acides tartrique et malique seraient plus toxiques que l'acide citrique : à 0,5 ou 1 p. 100, ces deux acides seraient sans action; à 2 p. 100, seuls quelques flagellés résistent; à 4-6 p. 100, ils meurent. L'acide oxalique à 1 p. 100 est toxique. La sensibilité d'*Euglena gracilis* aux acides minéraux serait plus considérable.

Ternetz (1912) arrive à des résultats différents de ceux de Zumstein. D'après cet auteur, un milieu peptoné additionné d'acide citrique à 1 p. 100 permet de très bonnes cultures.

D'autre part, en quantités équimoléculaires, les acides lactique, tartrique et citrique se comportent exactement de la même façon.

Dans les milieux synthétiques (à base de sulfate d'ammonium, par exemple), la proportion d'acide citrique supportée par *Euglena gracilis* est moins grande que celle supportée en milieu peptoné. Une proportion de 0,01 p. 100 empêche complètement la culture en milieu synthétique.

Ces différences entre milieux synthétiques et milieux peptonés sont certainement dues à l'effet tampon de la peptone.

Ternetz a étudié la souche isolée par Zumstein.



Pringsheim (1913), sur une souche qu'il a isolée, constate que les flagellés ne supportent qu'une concentration très faible d'acide citrique (0,12 p. 100 ou moins).

L'acide citrique à 0,5 p. 100 en milieu peptoné empêche à peu près complètement le développement.

Cependant, pour Pringsheim, une réaction légèrement acide est favorisante; une réaction alcaline est nuisible.

Kostir (1921) étudie comparativement plusieurs espèces d'Euglènes. Il détermine pour chaque espèce la dose d'acide citrique tuant tous les organismes en vingt-quatre heures.

*Euglena gracilis* reste vivant pendant vingt-quatre heures dans l'acide citrique à 4 p. 100, mais toutes les autres espèces sont tuées en vingt-quatre heures dans l'acide à 0,1 ou 0,25 p. 100. Elles sont donc beaucoup plus sensibles qu'*Euglena gracilis*.

Tannreuther (1923), travaillant avec des cultures impures, conclut qu'*Euglena gracilis* supporte mal un milieu neutre ou acide, tandis qu'un milieu alcalin est favorable.

Mainx (1924-1928), expérimentant avec une culture bactériologiquement pure, constate, comme Pringsheim, qu'*Euglena gracilis* ne supporte pas des concentrations importantes d'acide citrique ( $> 1/100$  N.). Le meilleur développement est obtenu dans des milieux neutres ou légèrement acides (milieux à l'extrait de Liebig).

#### TRAVAUX PERSONNELS. CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES.

Aucun des auteurs cités n'a déterminé le pH des milieux de culture. Etant donné, d'une part, l'importance du pouvoir tampon des peptones, d'autre part le fait que les divers auteurs ont travaillé avec des milieux de composition chimique différente, nous avons supposé que les résultats divergents obtenus avec des concentrations égales en acide citrique pourraient être dus à des différences de pH des milieux de culture (causées en particulier par la valeur tampon des produits organiques).

Nous avons donc étudié l'influence de la concentration en ions H du milieu de culture sur le développement d'*Euglena gracilis*.

Nous avons utilisé le milieu peptoné dont la formule a été donnée ci-dessus (v. p. 555).

Toutes les expériences ont été faites dans des tubes en verre pyrex, les cultures étant maintenues à la lumière.

Le milieu peptoné était amené, avant stérilisation, au pH voulu par addition de HCl ou de NaOH.

Le pH a été déterminé par la méthode colorimétrique, à 0,2 près.

Le pH était vérifié avant l'ensemencement, c'est-à-dire après la stérilisation et au cours ou à la fin du développement des cultures.

Les milieux (non ensemencés) dont le pH est supérieur à 8,5, par exemple 9,0, sont ramenés assez rapidement, en deux ou trois jours, à pH 8,5, probablement par le CO<sup>2</sup> atmosphérique.

Le changement de pH dû au développement de la culture est tout à fait minime. Le pH des cultures a été mesuré au cours de nombreuses expériences, après cinq semaines, sept semaines et vingt semaines. Dans un cas, le pH final a été mesuré après trente-trois semaines, et même après un an.

Nous noterons, par exemple, que le pH de deux milieux, respectivement à 3,5 et 4,0 avant l'ensemencement, n'avait subi aucune modification appréciable à la trente-troisième semaine de culture.

Une culture à pH 3,5, ensemencée le 6 avril 1931, a été suivie pendant un an. Le développement maximum a été atteint au cours de la quatrième semaine. Des formes palmelloïdes sont apparues durant la vingt-cinquième semaine. A partir de cette époque, des cadavres de plus en plus nombreux s'accumulent au fond du tube. Après un an, le 6 avril 1932, il y a encore quelques flagellés mobiles. Le pH est toujours 3,5.

Nous pouvons donc considérer que le développement d'une culture d'*Euglena gracilis* ne provoque pas de changement du pH du milieu de culture peptoné comme celui que nous avons utilisé. Constatation importante puisqu'elle nous permet d'étudier le développement d'une culture dans un milieu de pH donné, à pH constant.

EXPÉRIENCES MONTRANT LE DÉVELOPPEMENT DE LA CULTURE  
d'*Euglena gracilis*  
DANS DES MILIEUX PEPTONÉS DE pH DIVERS.

L'ensemencement a été fait à partir d'une souche entretenue à pH 7,0 avec une goutte de culture pour environ 10 cent. cubes de milieu.

Nous noterons tout de suite que les tubes, qui étaient à pH 9,0 le jour de l'ensemencement, sont très rapidement revenus à pH 8,5 et que c'est à ce pH que s'est poursuivi le développement. Il n'y a donc pas lieu de tirer une conclusion quelconque de ce fait, sinon que *E. gracilis* supporte parfaitement, pendant quelques heures au moins, un milieu de pH 9,0, conclusion que nous trouverons lorsque nous étudierons les milieux peptonés additionnés d'acétate de sodium.

FORME DES EUGLÈNES. — Nous pouvons considérer arbitrairement comme « normale » ou « moyenne » la forme qui se développe à pH 7,0.

MILIEUX ACIDES. — Les flagellés qui ont vécu dans un milieu de pH 3,0, 3,5 ou 4,0 sont notablement plus minces, plus grêles que les flagellés moyens. Les proportions habituelles sont conservées. Les mouvements normalement actifs sont lents, paresseux. La teinte, normalement vert franc, est pâle, tirant sur l'olive. Ces caractères particuliers des flagellés dans les milieux très acides sont extrêmement nets dans les premiers jours et même les premières semaines (jusqu'à quatre semaines) du développement. Par la suite, les différences disparaissent progressivement et les flagellés reprennent leur taille, leur mobilité et leur teinte normales.

MILIEUX ALCALINS. — Les flagellés qui se sont multipliés dans des milieux alcalins, pH 8,0 ou 8,5, sont légèrement hypertrophiés et déformés. Les mouvements sont normaux. L'examen microscopique de nombreux flagellés révèle une apparence noirâtre généralisée qui se superpose à la teinte verte normale. Cette pigmentation particulière est difficile à

définir avec précision, étant donnée l'abondance de la chlorophylle. Ce phénomène constant dans les cultures trop alcalines nous paraît pathologique.

EVOLUTION DES CULTURES. — Pour mesurer la vitesse de croissance des flagellés dans un milieu donné, on pourrait mesurer l'intervalle qui sépare deux divisions. Ce procédé nécessiterait une installation considérable et obligerait à séparer les individus-fils dès la division.

Nous nous sommes contenté d'étudier le développement de la culture considérée dans son ensemble. Une remarque très importante s'impose ici :

Quel que soit le  $pH$  du milieu, entre 3,5 et 8,5, toutes les cultures arrivent à un développement identique, c'est-à-dire que la densité des Euglènes, leur nombre par millimètre cube de milieu, sont sensiblement les mêmes. Mais ce qui varie, c'est le temps au bout duquel cette croissance maximum se trouve réalisée :

Considérons tout d'abord l'évolution d'une culture normale à  $pH$  7,0.

La densité maximum se trouve réalisée du vingt et unième au trente-cinquième jour environ. (Chiffres variables naturellement suivant les conditions de lumière et de température.)

A ce moment, il n'y a que des formes flagellées normales.

Cet état normal se poursuit de deux à trois semaines.

A ce moment apparaissent des formes à extrémité postérieure renflée ; leur nombre augmente progressivement, mais il persistera en général toujours des flagellés normaux.

Peu de temps après les flagellés hypertrophiés et déformés, apparaissent des formes palmelloïdes. D'une manière générale, nous pouvons dire que ces formes palmelloïdes apparaissent toujours dans des conditions défavorables, soit que le milieu nutritif s'épuise ou qu'il soit insuffisant, soit que la culture soit trop ancienne, soit que la température soit trop basse ou trop élevée.

De nombreux flagellés meurent et leurs cadavres s'accumulent au fond du tube. Le nombre des palmelloïdes augmente et le nombre des formes mobiles diminue.



Cette évolution est la même, quel que soit le  $pH$  entre 3,0 et 8,5, mais sa durée varie beaucoup.

Dans les milieux très acides,  $pH$  3,0-3,5, le développement est beaucoup plus lent, c'est-à-dire que la densité maximum n'est atteinte que vers la septième à la dixième semaine.

La vitesse de multiplication est légèrement supérieure dans les milieux de  $pH$  4,05, 6 et 6,5. Dans un milieu de  $pH$  7,5 et surtout 8,0 et 8,5, la vitesse de développement est légèrement supérieure à la vitesse de développement des cultures en milieu de  $pH$  7,0.

D'une manière générale, on peut dire que la vitesse de développement d'une culture d'*Euglena gracilis* en milieu peptoné croît avec le  $pH$ . Cependant les différences très marquées ne s'observent que dans les milieux très acides, de  $pH$  3,0 ou 3,5, dans lesquels le développement est très lent (1).

**INFLUENCE DU  $pH$  DE DÉPART.** — Mainx (1928), étudiant le comportement d'*Euglena gracilis* dans un milieu à base de sulfate d'ammonium, constate que pendant le développement de la culture, et du fait de ce développement, le  $pH$  du milieu, primitivement voisin de la neutralité, est progressivement amené au voisinage de 4,0. Dans ce milieu de  $pH$  4,0, les flagellés continuent à se multiplier, mais il a été impossible à Mainx de transporter directement des *Euglena gracilis* d'un milieu neutre dans un milieu très acide.

Dans nos expériences précédemment décrites, l'ensemencement des milieux était effectué à partir de souches à  $pH$  7,0 et nous avons vu que, dans ces conditions, le développement était parfaitement possible, quoique ralenti, à  $pH$  3,0 et 3,5. Notons cependant que nous opérons dans des milieux peptonés alors que Mainx a expérimenté sur des milieux à base de sulfate d'ammonium. Cette différence très importante de l'aliment azoté pourrait suffire à expliquer la divergence de nos résultats.

Etant donné cependant le ralentissement du développement

(1) Dans notre première note (H. Dusi, 1930, *a*) nous avons indiqué que la densité des cultures considérées au point optimum du développement, en milieu de  $pH$  3,5 et 4,0, était moins grande que dans les milieux de  $pH$  4,5 à 8,5. Tels étaient en effet les résultats de notre première série d'expériences (3 séries). Les résultats d'autres séries qui seront exposés maintenant ont été légèrement différents et nous avons rectifié nos premières conclusions.

constaté dans les milieux de  $pH$  3,0 et 3,5, nous nous sommes demandé si ce ralentissement n'était pas dû au changement brusque du  $pH$ .

Nous avons donc réalisé les expériences suivantes :

A partir de la souche entretenue à  $pH$  7,0, onensemence un tube de milieu peptoné à  $pH$  5,5. Lorsque la culture s'est développée dans ce tube (trente jours), on effectue des repiquages dans des tubes de milieu de  $pH$  4,0-4,5-5,0 et 5,5.

Le développement a été plus lent à  $pH$  4,0 qu'à  $pH$  4,5-5,0 et 5,5.

Nous n'insistons pas sur les résultats de cette expérience, nous réservant de tirer des conclusions de la dernière de celles qui seront exposées maintenant :

A partir du tube à  $pH$  4,5 de la série précédente, sontensemencés deux tubes à  $pH$  4,5 et 4,0.

A partir du tube à  $pH$  4,0 de la même série, sontensemencés deux tubes à  $pH$  4,0 et 3,5. A partir de ce dernier tube à  $pH$  3,5, sontensemencés deux tubes à  $pH$  3,5 et 3,0. A partir de cette culture, développée à  $pH$  3,0 — s'étant donc développée successivement à  $pH$  5,5-4,0-3,5-3,0 — et à partir d'un tube de la culture souche entretenue à  $pH$  7,0, nous ensemençons deux séries de 5 tubes à  $pH$  3,0.

Donc chacune de ces séries de tubes provenant soit de la souche entretenue en milieu acide ( $pH$  3,0), soit de la souche entretenue en milieu neutre ( $pH$  7,0), le développement a été identique : développement lent.

Ces expériences ont été refaites plusieurs fois : dans une autre série par exemple, une souche a été entretenue à  $pH$  3,5 pendant vingt mois. Le développement en milieu acide n'est pas accéléré.

On voit donc que la lenteur du développement que nous observons dans les milieux très acides n'est pas due au changement brusque du  $pH$ , mais au  $pH$  même du milieu puisque la vitesse de multiplication est la même, que l'ensemencement soit fait à partir d'une culture entretenue en milieu neutre ou en milieu très acide.

MILIEU A  $pH$  VARIABLE A L'ACÉTATE DE SODIUM. — Nous avons dit qu'*Euglena gracilis* peut vivre quelques heures dans des

milieux de  $pH$  9,0, mais que les milieux peptonés s'acidifient rapidement. Pour étudier le développement des flagellés dans des milieux très alcalins, nous avons utilisé des milieux peptonés additionnés de 2 p. 1.000 d'acétate de sodium (point de départ  $pH$  7,0).

Dans ces conditions les milieux s'alcalinisent rapidement. Après un mois de culture, le  $pH$  du milieu est en général au voisinage de 9,0. Après deux mois, il dépasse 9,5 (le  $pH$  n'a pas été déterminé avec précision).

Au moment où est atteint le  $pH$  9,0, la culture atteint à peu près sa densité maximum. Il est donc difficile de dire si les *Euglènes* continuent à se multiplier dans les milieux de  $pH$  9,0 : mais en tous cas elles y paraissent en excellent état, ne présentent pas de déformation et sont normalement mobiles (il y a naturellement des palmelloïdes).

Des expériences analogues ont été réalisées en remplaçant l'acétate de sodium par du butyrate de sodium. Les résultats ont été tout à fait comparables à ceux obtenus avec l'acétate de sodium, mais en général, même après soixante jours, le  $pH$  dépasse rarement 9,0.

Avec les sels de sodium d'autres acides : acides lactique, glycérophosphorique, pyruvique, succinique, tartrique, citrique, les résultats sont différents.

Les milieux au lactate et au pyruvate de sodium subissent, du fait du développement de la culture, une légère augmentation de  $pH$  ;  $pH$  7,8 à 8,0 au sixantième jour. Avec les autres acides, il n'y a pas d'alcalinisation.

Ces résultats s'expliqueront d'eux-mêmes lorsque nous étudierons la nutrition carbonée d'*Euglena gracilis* (v. p. 595).

#### $pH$ LIMITE COMPATIBLE AVEC LE DÉVELOPPEMENT ET LA SURVIE.

Une culture d'*Euglena gracilis* a pu être entretenue en milieu peptoné dans un milieu de  $pH$  3,0 pendant plus de huit mois. (Les expériences continuent actuellement.) A partir de cette souche, nous avonsensemencé un milieu peptoné de  $pH$  2,5. Il n'y a jamais eu de culture dans ce milieu, mais les flagellés n'ont pas été tués immédiatement, car on retrouve de très rares formes palmelloïdes qui dérivent indubitablement

des flagellés introduits par l'ensemencement. Ces tubes ont été suivis pendant plus de trois mois et n'ont jamais montré de développement.

La limite acide est donc située entre  $pH$  2,5 et 3,0.

Quant à la limite alcaline, elle est difficile à préciser. *Euglena gracilis* se multiplie certainement jusqu'à  $pH$  9,0, peut parfaitement vivre à  $pH$  9,5, mais nous n'avons pas atteint le  $pH$  limite compatible avec la survie, ni déterminé avec précision le  $pH$  limite au delà duquel la multiplication n'est plus possible. Nous croyons importante cette distinction entre  $pH$  permettant la survie et  $pH$  permettant la multiplication.

Depuis la publication de notre note préliminaire sur les limites de la concentration en ions H pour *Euglena gracilis*, sont parus deux travaux sur cette question : un mémoire de Gordon Alexander (1931) et un mémoire de Théo.-Jahn (1931). Gordon Alexander, qui n'a pas eu connaissance de nos travaux, arrive à des résultats quelque peu différents des nôtres.

Travaillant avec une souche d'*Euglena gracilis* isolée par lui, cet auteur compte le nombre moyen de divisions pendant une période de quarante-huit ou de soixante-douze heures, dans un milieu peptoné, soit à la lumière, soit à l'obscurité, et arrive aux conclusions suivantes :

En milieu bien peptoné, bien aéré, il y a peu de différence entre la vitesse de division entre  $pH$  7,7 et 4,5 à la lumière et entre  $pH$  7,7 et 3,0 à l'obscurité. A  $pH$  6,7, il y a une augmentation très faible de la vitesse de multiplication qui indique qu'un optimum pourrait exister pour cette valeur de  $pH$ . Pour Alexander, la limite absolue de la vie (*absolute limits of life*) serait approximativement  $pH$  2,3 et 11,0.

Il y a décoloration plus ou moins complète à la lumière au-dessus de  $pH$  5,0. Nous n'avons jamais observé de décoloration à la lumière, même dans des milieux de  $pH$  3,0. Il y a probablement là une question de souche.

Nous remarquerons, d'après les courbes de Gordon Alexander, que le nombre moyen de divisions en quarante-huit heures, à  $pH$  3,0, est voisin de 2,5, alors qu'il approche de 4 entre  $pH$  5 et 7 (voir tableau). Les résultats de Gordon Alexander sont donc en harmonie avec nos constatations (vitesse de multiplication réduite dans les milieux très acides).



Quant aux chiffres limites de  $pH$ , comparables avec la vie, que G. Alexander assigne à *Euglena gracilis* : 2,3 et 11,0, ils nous paraissent pouvoir être discutés. A  $pH$  2,5 nous n'avons jamais vu de multiplication d'*Euglena gracilis*, mais une légère survie. Quant aux milieux alcalins, nous n'avons jamais étudié de milieux de  $pH$  supérieur à 9,6. Il nous paraît en tout cas regrettable que Gordon Alexander n'ait pas cru devoir indiquer les expériences dont il a conclu ce chiffre limite qui, *a priori*, paraît extrêmement élevé.

Jahn (1931), travaillant avec la souche de Prague d'*Euglena gracilis* en cultures bactériologiquement pures dans un milieu où l'aliment azoté est fourni sous deux formes : a) minérale : *nitrate de potassium*; b) organique : peptone, arrive à la conclusion qu'il y a une grande vitesse de multiplication entre  $pH$  3,9 et 7,5 avec un maximum aux environs de 6,6 et une diminution régulière de cette vitesse avec l'augmentation de l'alcalinité entre  $pH$  7,5 et 9,9. Jahn constate également qu'à la septième semaine la croissance maximum a eu lieu dans la série alcaline et que la densité maximum de la culture est à  $pH$  7,5.

Ces constatations sont, dans leurs grandes lignes, tout à fait comparables aux nôtres. Il apparaît, en effet, d'après les travaux de Jahn (qui n'a observé ses cultures que vers le huitième ou dixième jour et la septième semaine), que, malgré une vitesse de multiplication maximum à  $pH$  6,6, les cultures, la septième semaine, sont plus abondantes à  $pH$  7,6 qu'à  $pH$  6,6. Il y a là une contradiction que Jahn n'a pas remarquée.

Mais cette contradiction n'est qu'apparente. Nous avons montré en effet que, quelle que soit la vitesse de multiplication dans un milieu, la densité finale des cultures était très sensiblement identique.

Seul est variable le temps nécessaire à l'établissement de ce maximum, et il est nécessaire de suivre les cultures pendant un temps très long, plusieurs mois, et de les observer à des intervalles réguliers (au maximum une semaine) pour pouvoir tirer des conclusions valables.

Jahn écrit dans son travail : « The only disagreement between  
« the present results and those of previous workers is with the  
« results of Dusi (1930) who found that cultures of approxi-

« mately the same density (macroscopic appearance) were  
 « obtained from pH 4,5 to pH 8,5... » Jahn n'a probablement  
 pas lu avec attention ma note (1930 *a*) dont voici la conclusion :  
 « *Euglena gracilis* peut donc se multiplier dans des milieux  
 « dont le pH est compris entre 3,5 et 9,0. Dans ces milieux, la  
 « vitesse de multiplication croît régulièrement de pH 3,5 à 8,5  
 « et la densité de la culture considérée au point optimum du  
 « développement est la même, quel que soit le pH, entre pH 4,5  
 « et 8,5. »

Nos résultats sont donc en accord quant à la vitesse de multiplication plus lente dans les milieux acides.

Cette multiplication est même tellement lente à pH 3,0 et 3,5 que Jahn, qui n'a pas étudié ses cultures pendant un temps assez prolongé, est arrivé, à tort selon nous, à la conclusion qu'il n'y a pas de multiplication entre pH 2,0 et 3,6. Il y a certainement multiplication très lente à pH 3,0 et 3,5.

Les conclusions de Jahn doivent donc rester limitées aux tout premiers jours du développement des cultures, période qu'il a été le premier à étudier avec précision dans des conditions expérimentalement rigoureuses.

### Nutrition à la lumière.

#### HISTORIQUE.

Ainsi que nous l'avons écrit dans l'introduction de ce mémoire (v. p. 551), nous ne retiendrons, parmi les travaux sur la nutrition des flagellés, que ceux ayant été effectués avec des cultures bactériologiquement pures. C'est pourquoi nous négligerons systématiquement les remarques de Klebs (1883), les observations et les conclusions de Dangeard (1901) et les expériences de Tannreuther (1923).

C'est Zumstein (1899) qui réalise pour la première fois la culture bactériologiquement pure d'*Euglena gracilis*. Il réussit la culture dans un milieu peptoné, mais ne réussit pas la culture en milieu minéral. Le seul milieu minéral essayé par Zumstein a été le liquide de Knop, qui renferme les sels suivants :  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KNO}_3$ . Les essais furent

négatifs. Négatifs aussi les essais dans le milieu de Knop modifié en remplaçant le nitrate de calcium par le biphosphate de sodium.

Il ne paraît en tous cas pas douteux pour Zumstein, que, même avec les combinaisons les plus favorables de sels inorganiques, la culture ne doit jamais se développer aussi bien que dans un milieu organique approprié. C'était là une conclusion que Zumstein tirait : 1° des résultats négatifs de ses essais en milieu de Knop; 2° des résultats favorables obtenus en milieu peptoné; 3° de l'hypothèse que les sels d'ammonium *devaient* permettre une culture que ne permettaient pas les sels de l'acide nitrique.

Zumstein n'eut pas le temps de réaliser cette expérience et c'est Charlotte Ternetz (1912) qui reprit des travaux et essaya de vérifier ses idées, avec la souche même isolée par Zumstein.

Les milieux préparés par Zumstein pour la culture à la lumière d'*Euglena gracilis* ont la constitution suivante :

Milieu 1.

Peptone. . . . .	5
Glucose . . . . .	5
Acide citrique . . . . .	2
MgSO <sub>4</sub> + 7H <sub>2</sub> O . . . . .	0,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	0,5
Eau . . . . .	1.000

Milieu 2.

Peptone. . . . .	10
Glucose. . . . .	4
Acide citrique. . . . .	4
SOMg + 7H <sub>2</sub> O . . . . .	0,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	0,2
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> . . . . .	0,5
Eau . . . . .	980

Ces milieux, actuellement classiques, sont beaucoup trop compliqués : le glucose, l'acide citrique ne sont pas indispensables et la peptone apporte, nous le verrons, tous les sels nécessaires à l'entretien indéfini des cultures d'*Euglena gracilis*. Il reste en tous cas à Zumstein le grand mérite d'avoir réalisé la première culture bactériologiquement pure d'*Euglena gracilis*.

Nous noterons toutefois que certains auteurs comme Nakano

(1917), Kufferath (1930) mettent en doute la pureté bactériologique des cultures de Zumstein. Celui-ci en effet supprimait les bactéries par culture en milieu acidifié par l'acide citrique. Les épreuves de pureté bactériologique effectuées par Zumstein sont évidemment insuffisantes. Zumstein n'a pas « vu » de bactéries dans son milieu peptoné, mais il est possible que certaines bactéries — et on en connaît qui supportent des milieux très acides — aient pu pénétrer en petit nombre dans de tels milieux.

La question est en tous cas impossible à trancher rétrospectivement, mais étant donné le progrès marqué par le travail de Zumstein, étant donnés surtout les problèmes qu'il a posés : nutrition organique, décoloration à l'obscurité, et les recherches qu'ont fait naître ses conclusions, il nous semble qu'il est juste d'accorder à Zumstein la priorité de la culture pure d'*Euglena gracilis*.

Les résultats de Ternetz (1912) ont été critiqués également par Nakano et il est bien évident que cet auteur ne donne sur les épreuves de pureté bactériologique par lui employées que des éclaircissements tout à fait insuffisants.

D'autre part, la méthode expérimentale même laisse à désirer. C'est ainsi que Ternetz, pour étudier la valeur nutritive d'un milieu donné, y transporte des Euglènes cultivées en milieux peptonés et lavées. Mais parfois les organismes ne sont pas lavés, c'est-à-dire que la peptone n'est pas éliminée. Enfin, jamais Ternetz n'effectua de repiquage en séries dans un milieu donné. Dans ces conditions, il est bien évident que les conclusions de cet auteur n'ont pas grande valeur. Nous indiquerons cependant les principales expériences de Ternetz.

Ternetz a étudié la valeur alimentaire des sels suivants : nitrate de potassium, sulfate d'ammonium, nitrate de calcium, nitrate d'ammonium, phosphate d'ammonium (mono- et tribasique), carbonate d'ammonium.

Sa conclusion est que les sels d'ammonium (sauf le carbonate et le nitrate) sont très supérieurs aux sels de l'acide nitrique.

D'autre part, Ternetz a étudié un certain nombre de corps azotés organiques : glycocolle, alanine, leucine, acide aspartique, *Na asparaginicum*, acide hippurique, asparagine, urée, acide urique (témoin du sulfate d'ammonium).



L'asparagine, le glyocolle, l'aspartate de sodium, l'alanine ont donné les meilleurs résultats.

Dans un milieu à base de sulfate d'ammonium, Ternetz a pu constater que le dextrose, le saccharose, le maltose et la mannite provoquaient un enrichissement de la culture.

Enfin, du milieu peptoné de Zumstein, on peut supprimer l'acide citrique et le glucose.

Toutes les expériences citées ici ont été faites à la lumière. Etant donné la méthode suivie, les conclusions de ces expériences ne peuvent être acceptées que sous bénéfice d'inventaire. Ternetz a eu toutefois le mérite, sinon de résoudre, tout au moins de poser un certain nombre de problèmes.

E. G. Pringsheim (1913) réussit à isoler *Euglena gracilis* en culture bactériologiquement pure. Les épreuves bactériologiques qu'il a faites ne peuvent laisser aucun doute sur la valeur des résultats par lui obtenus.

La purification n'a pu être obtenue par la méthode de Zumstein, milieux acidifiés par l'acide citrique : ce procédé permet la survie et la culture de certaines moisissures. Pringsheim a réussi l'isolement par ensemencement sur plaques de gélose à l'asparagine à 1 p. 1.000 (isolement de la souche en juin 1910).

Comme Ternetz, Pringsheim constate que le sucre n'est pas indispensable dans les milieux organiques.

Pringsheim a étudié le développement de la culture dans divers milieux minéraux et organiques. Le nitrate de potassium et des sels d'ammonium (phosphate, carbonate) ont été étudiés.

Comme aliments organiques, ont été utilisés une peptone, de l'extrait de Liebig, et une décoction de petits pois ayant subi une action bactérienne.

Pringsheim tire de ses expériences la conclusion suivante : si la lumière est suffisante, les milieux minéraux, à condition que la réaction du milieu soit convenable, permettent un développement aussi abondant que les milieux organiques. Il n'y a pas de différence de valeur nutritive entre les sels nitriques et les sels ammoniacaux. Pour Pringsheim, *Euglena gracilis* est donc un organisme parfaitement autotrophe, conclusion que tous les auteurs devaient par la suite vérifier.

Pringsheim n'a pas réussi à cultiver *Euglena gracilis* dans

des milieux minéraux pendant les mois d'hiver, même à une fenêtre exposée au sud et attribuée à la lumière un rôle très important.

Nous noterons aussi que Pringsheim n'a effectué qu'un seul ensemencement dans les milieux à étudier, quoique les milieux minéraux aient étéensemencés à partir d'un milieu organique.

Mainx (1924 et 1928) travaille comme Pringsheim avec des cultures dont la pureté bactériologique ne peut être mise en question. Il ne semble pas que Mainx ait effectué des repiquages en série dans les milieux qu'il a étudiés.

A un milieu minéral contenant du biphosphate de potassium 0,2 p. 1.000, du sulfate de magnésium 0,1 p. 1.000, du fer (traces), Mainx ajoute comme aliment azoté (1 p. 1.000) du nitrate de calcium et du nitrate de potassium, du sulfate d'ammonium et du nitrate d'ammonium. Les sels d'ammonium permettent de bonnes cultures, le nitrate de potassium des cultures moins riches.

Mainx remarque d'autre part que l'addition de sels de fer à ces milieux n'est pas indispensable.

Mainx a remplacé l'aliment azoté minéral par différents composés organiques : acides aminés, peptone.

Les acides aminés suivants : glycocolle, leucine, acide glutamique et asparagine, à une concentration de 1 à 5 p. 1.000, ont été essayés : le glycocolle et la leucine n'ont pas permis la culture, l'acide glutamique des cultures pauvres, l'asparagine de bonnes cultures. Mainx s'étonne de voir les acides aminés donner de moins bons résultats que les sels d'ammonium.

Mainx étudie ensuite trois « peptones ». La peptone de Witte, de la gélatine digérée par la trypsine, et de l'éreptone (muscle ayant subi successivement une digestion pepsique, trypsique et érepsique). Ces trois « peptones » donnent d'excellents résultats. Le fait que l'éreptone, qui ne renferme que des acides aminés, permet une très bonne culture d'*Euglena gracilis*, a incité Mainx à réaliser des mélanges d'acides aminés : ces mélanges n'ont permis que des cultures très pauvres.

Mainx attribue à des traces de métaux lourds les mauvais résultats obtenus avec les acides aminés et les sels d'ammonium.

Les peptones lui ont donné des résultats bien meilleurs.

ESSAIS PRÉLIMINAIRES. — Dans une première série, nous avons essayé d'entretenir une culture d'*Euglena gracilis* dans un milieu minéral où l'aliment était soit du nitrate de calcium, soit du nitrate de potassium, soit du nitrate d'ammonium. Plusieurs milieux ont été essayés dont nous donnons ci-dessous les formules. Ces formules ne donnent pas la nature de l'aliment azoté qui était ajouté à une concentration de 1 p. 1.000.

## A. NITRATE DE CALCIUM.

*Milieu de Detmer (d'après Mollard).*

1° $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . . . . .	1,0
$\text{MgSO}_4$ . . . . .	0,25
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ . . . . .	0,25
$\text{KCl}$ . . . . .	0,25
$\text{Fe}^2\text{Cl}^6$ . . . . .	Traces.

*Milieu de Knop (d'après Küster).*

2° $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . . . . .	1,0
$\text{MgSO}_4$ . . . . .	0,25
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ . . . . .	0,25
$\text{KNO}_3$ . . . . .	0,25
$\text{Fe}^2\text{Cl}^6$ . . . . .	Traces.

3° $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . . . . .	1,0
$\text{MgSO}_4$ . . . . .	0,25
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ . . . . .	0,25
$\text{NaCl}$ . . . . .	0,25
$\text{Fe}^2\text{Cl}^6$ . . . . .	Traces.

4° $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . . . . .	1,0
$\text{MgSO}_4$ . . . . .	0,25
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ . . . . .	0,25
$\text{Fe}^2\text{Cl}^6$ . . . . .	Traces.

## B. NITRATE DE POTASSIUM.

5° $\text{KN}_3$ . . . . .	1,0
$\text{MgSO}_4$ . . . . .	0,25
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ . . . . .	0,25
$\text{CaCl}_2$ . . . . .	0,25
$\text{Fe}^2\text{Cl}^6$ . . . . .	Traces.

*Milieu de Günther (1928).*

6° $\text{KNO}_3$ . . . . .	1,0
$\text{MgSO}_4$ . . . . .	0,25
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ . . . . .	0,25
$\text{KCl}$ . . . . .	9,2
$\text{CaSO}_4$ . . . . .	0,5
$\text{Fe}^2\text{Cl}^6$ . . . . .	Traces.

*Milieu de Sachs (d'après Küster).*

7°	KNO <sup>3</sup> . . . . .	1,0
	MgSO <sup>4</sup> . . . . .	0,5
	Ca(H <sup>2</sup> PO <sup>4</sup> ) <sup>2</sup> . . . . .	0,5
	CaSO <sup>4</sup> . . . . .	0,5
	NaCl . . . . .	0,5
	Fe <sup>2</sup> Cl <sup>6</sup> . . . . .	Traces.
8°	KNO <sup>3</sup> . . . . .	1,0
	MgSO <sup>4</sup> . . . . .	0,5
	Ca(H <sup>2</sup> PO <sup>4</sup> ) <sup>2</sup> . . . . .	0,5
	CaSO <sup>4</sup> . . . . .	0,5
	Fe <sup>2</sup> Cl <sup>2</sup> . . . . .	Traces.
9°	KNO <sup>3</sup> . . . . .	1,0
	MgSO <sup>4</sup> . . . . .	0,25
	KH <sup>2</sup> PO <sup>4</sup> . . . . .	0,25
	Fe <sup>2</sup> Cl <sup>6</sup> . . . . .	Traces.

## C. NITRATE D'AMMONIUM.

*Milieu de Beijerinck (d'après Kufferath) et Benæcke (d'après Prowazek) modifié.*

10°	NH <sup>4</sup> NO <sup>3</sup> . . . . .	1,0
	MgSO <sup>4</sup> . . . . .	0,25
	KH <sup>2</sup> PO <sup>4</sup> . . . . .	0,25
	CaCl <sup>2</sup> . . . . .	0,25
	Fe <sup>2</sup> Cl <sup>6</sup> . . . . .	Traces
11°	NH <sup>4</sup> NO <sup>3</sup> . . . . .	1,0
	MgSO <sup>4</sup> . . . . .	0,25
	KH <sup>2</sup> PO <sup>4</sup> . . . . .	0,25
	NaCl <sup>2</sup> . . . . .	0,25
	Fe <sup>2</sup> Cl <sup>6</sup> . . . . .	Traces.
12°	NH <sup>4</sup> NO <sup>3</sup> . . . . .	1,0
	MgSO <sup>4</sup> . . . . .	0,25
	KH <sup>2</sup> PO <sup>4</sup> . . . . .	0,25
	Fe <sup>2</sup> Cl <sup>6</sup> . . . . .	Traces.

Tous ces milieux ont donné des résultats qui dépendent uniquement de la nature de l'aliment azoté : le nitrate d'ammonium a permis de bonnes cultures (trois repiquages); les nitrates de calcium et de potassium, des cultures très pauvres au premier repiquage, extrêmement pauvres au deuxième.

Nous avons finalement adopté le milieu suivant suivi de la formule de Detmer.



## Milieu n° 1.

MgSO <sup>4</sup> . . . . .	0,2
KH <sup>2</sup> PO <sup>4</sup> . . . . .	0,2
KCl. . . . .	0,2
Fe <sup>2</sup> Cl <sup>6</sup> . . . . .	0,0025
Eau bi-distillée. . . . .	1.000

A ce milieu, on ajoutait 1 gramme (pour 1.000 cent. cubes de milieu) du corps azoté à étudier.

Le milieu était ajusté au *pH* voulu par addition de soude.

Toutes les expériences qui seront exposées ici ont été poursuivies jusqu'au troisième repiquage dans trois milieux de *pH* 6,5, 7,0, 7,5.

Le développement n'ayant été influencé en rien par le *pH* du milieu, nous avons, par la suite, continué toutes nos expériences dans des milieux de *pH* 7,0.

Ce milieu est dépourvu de calcium, comme les milieux minéraux de Ternetz et de Mainx.

Nous nous sommes assuré que l'addition de sels de calcium n'exerçait aucune action sur l'intensité du développement.

Les flagellés ont étéensemencés dans le milieu n° 1 et dans un milieu semblable dans lequel le chlorure de potassium a été remplacé par du chlorure de calcium.

L'aliment azoté ayant été soit du phosphate, soit du sulfate d'ammonium, les cultures ont subi deux repiquages; nous n'avons noté aucune différence de développement entre les deux séries de milieux.

Cette expérience confirme donc la conclusion de Mainx relativement à la non-nécessité du chlorure de calcium. Toutefois, il est très possible que le calcium ait été présent à l'état de trace, sous forme d'impuretés dans les sels entrant dans la constitution du milieu.

La seule conclusion que nous sommes en droit de tirer de ces expériences, c'est qu'il n'est pas nécessaire d'ajouter du calcium au milieu de culture, c'est-à-dire que, si le calcium est indispensable, des traces de ce corps suffisent à assurer la multiplication d'*Euglena gracilis*.

Cette conclusion ne doit pas être généralisée; nous verrons, en effet, qu'*Euglena stellata*, en ce qui concerne le calcium, est plus exigeante qu'*Euglena gracilis*.

Donc, au milieu n° 1, nous avons ajouté un certain nombre de source azotées.

#### NITRATES ET SELS D'AMMONIUM.

1° NITRATE DE CALCIUM. — Repiquage à partir d'un milieu peptoné. Les tubes, contenant 10 à 12 cent. cubes de milieu, sontensemencés avec une goutte de culture.

*Premier repiquage.* — Troisième semaine, culture très pauvre; quatrième semaine, culture pauvre; sixième semaine, culture toujours pauvre, quelques formes palmelloïdes; huitième semaine, pas de changement; treizième semaine, très peu de formes mobiles, la plupart palmelloïdes; vingtième semaine, uniquement des palmelloïdes.

*Deuxième repiquage* (à partir du premier, datant de quatre semaines). — Quatrième semaine, très rares flagellés; sixième semaine, sans flagellés; douzième semaine, culture très pauvre, rares palmelloïdes; vingt-deuxième semaine, uniquement des palmelloïdes.

*Troisième repiquage* (à partir du deuxième, datant de trois mois). — Troisième semaine, très rares flagellés; sixième semaine, le nombre des flagellés a diminué; dixième semaine, très rares flagellés.

*Remarque :* Ainsi que nous l'avons noté, trois séries d'expériences ont été poursuivies parallèlement, chacune avec plusieurs tubes, à pH 6,5-7,0 et 7,5. Aucune différence entre ces diverses séries.

Le *nitrate de calcium* a été étudié dans une autre expérience dans laquelle le premier repiquage a été effectué à partir d'une souche entretenue dans un milieu au sulfate d'ammonium. Le premier repiquage a montré des cultures extrêmement pauvres qui n'ont pas été réensemencées. La faible culture observée dans l'expérience précédente au premier repiquage était donc très probablement due à l'apport de traces de peptone.

2° NITRATE DE POTASSIUM. — Souche en milieu au sulfate d'ammonium.

*Premier repiquage.* — Deuxième, troisième semaines, culture très pauvre; septième et huitième semaines, culture pauvre; douzième semaine, culture pauvre; seizième semaine, quelques flagellés, des palmelloïdes; vingtième semaine, tous palmelloïdes.

*Deuxième repiquage.* — Quatrième à septième semaine, culture pauvre; dixième à dix-septième semaine, culture pauvre. Beaucoup de palmelloïdes.

*Troisième repiquage.* — Troisième semaine, culture très pauvre; huitième à dixième semaine, culture pauvre.

*Quatrième repiquage.* — Cinquième semaine, culture très pauvre; septième à dixième semaine, culture pauvre.

*Remarque :* Il y a dans ces cultures un changement de  $pH$  appréciable; par exemple,  $pH$  de départ, 6,5; dixième semaine, 7,6; vingtième semaine, 7,7- $pH$  de départ, 7,0; dixième semaine, 8,4; vingtième semaine, 8,5- $pH$  de départ, 7,5; dixième semaine, 8,5; vingtième semaine, 8,5.

3° NITRATE DE SODIUM. — Ensemencement à partir de culture en milieu au sulfate d'ammonium.

*Premier repiquage.* — Deuxième à troisième semaine, culture très pauvre; septième à huitième semaine, culture pauvre; douzième semaine, culture pauvre; seizième à vingtième semaine, presque tous palmelloïdes.

*Deuxième repiquage.* — Quatrième à septième semaine, culture pauvre; dixième à dix-septième semaine, culture pauvre.

*Troisième repiquage.* — Troisième semaine, culture très pauvre; huitième à dixième semaine, culture pauvre.

*Quatrième repiquage.* — Cinquième à septième semaine, culture pauvre; dixième semaine, culture pauvre.

*Remarque :* Pour le changement de  $pH$ , mêmes résultats que dans le milieu au nitrate de potassium.

4° NITRATE D'AMMONIUM. — Ensemencement à partir d'une culture en milieu peptoné.

*Premier repiquage* (avec V gouttes de culture). — Première semaine, bonne culture; deuxième et troisième semaines, bonne culture; quatrième semaine, culture en décroissance; apparition de palmelloïdes; septième semaine, culture pauvre; neuvième semaine, rares flagellés; treizième semaine, cadavres.

*Deuxième repiquage.* — (Ensemencement avec II gouttes de la culture du premier repiquage au septième jour) : Première semaine, bonne culture; deuxième et troisième semaines, bonne culture; sixième semaine, culture pauvre; huitième semaine, culture pauvre, formes de souffrance; douzième semaine, *idem*.

*Troisième repiquage.* — (Ensemencement avec II gouttes de la culture du deuxième repiquage) : Troisième à cinquième semaine, bonne culture; neuvième semaine, culture pauvre; seizième semaine, cadavres.

*Quatrième repiquage.* — (Ensemencement avec II gouttes de culture) : Deuxième, troisième, sixième semaines, bonne culture; dixième semaine, culture pauvre, 50 p. 100 environ de palmelloïdes; vingtième semaine, cadavres.

*Cinquième repiquage.* — (Ensemencement avec III gouttes de culture) : troisième semaine, bonne culture; quatrième, septième, dixième semaines, bonne culture.

*Sixième repiquage.* — (Ensemencement avec I goutte de culture) : troisième semaine, culture pauvre; cinquième, neuvième, treizième semaines, bonne culture; vingt-troisième semaine, culture pauvre.

*Septième repiquage.* — (Ensemencement avec I goutte) : Troisième semaine, culture pauvre; neuvième, treizième, seizième, dix-huitième semaines, bonne culture; vingtième semaine, décroissance.

*Huitième repiquage.* — (Ensemencement avec I goutte de culture) : troisième semaine, culture pauvre; quatrième semaine, bonne culture; neuvième, dixième, douzième semaines, très bonne culture; quatorzième semaine, décroissance.

*Neuvième repiquage.* — (Ensemencement avec I goutte de culture) : cinquième et septième semaines, très bonne culture; dixième semaine, décroissance.

*Remarques :* Cette expérience a duré treize mois, du 8 mai 1929 au 18 juin 1930.

Jusqu'au troisième repiquage inclusivement, les cultures ont été étudiées dans des milieux de  $pH$  différents : 4,8-6,4-7,0.

Par la suite, les repiquages ont été effectués dans des milieux de  $pH$  7,0.

Au cours de divers repiquages, nous avons étudié les variations du  $pH$ . Il y a toujours acidification. Par exemple, un milieu de  $pH$  initial 6,5 est à  $pH$  4,2 la vingtième semaine; un milieu de  $pH$  initial 7,0 est  $pH$  5,9; un milieu de  $pH$  initial 7,5 est à  $pH$  5,9, toujours à la vingtième semaine.

Dans une autre série, à la dixième semaine, le milieu de  $pH$  initial 6,5 est à 6,0; le milieu de  $pH$  7,0 à 6,3; le milieu de  $pH$  initial 7,5 est à  $pH$  6,5.

Cette acidification est vraisemblablement due à la consommation préférentielle de l'ion  $NH_4$ .

5° PHOSPHATE D'AMMONIUM (tribasique). — Ensemencement avec I goutte d'une culture en milieu au sulfate d'ammonium.

*Premier repiquage* (I goutte) : deuxième et troisième semaines, culture très pauvre; septième, huitième semaines, culture pauvre; douzième et seizième semaines, très bonne culture; vingtième semaine, quelques palmelloïdes.

*Deuxième repiquage* (I goutte) : troisième et quatrième semaines, culture pauvre; septième semaine, culture bonne; dixième semaine, très bonne culture; dix-septième semaine, quelques palmelloïdes.

*Troisième repiquage* (I goutte) : troisième semaine, culture très pauvre;



sixième semaine, très bonne culture; dixième semaine, quelques palmelloïdes.

*Quatrième repiquage* : cinquième semaine, culture pauvre; septième, dixième, douzième semaines, très bonne culture; quatorzième et seizième semaines, bonne culture, quelques palmelloïdes.

*Remarques* : Expérience poursuivie de novembre à juin. Il a été fait trois séries de repiquages à 6,5-7,0 et 7,5. Le développement de la culture est un peu plus rapide à pH 6,5.

Dans le milieu de pH initial 7,0 et 7,5 il y a une légère acidification; par exemple, à la seizième semaine, le pH est respectivement de 6,7 et 6,8. Les milieux de pH initial 6,6 n'ont pas subi de changement.

#### 6° SULFATE D'AMMONIUM (souche en milieu peptoné):

*Premier repiquage* (1 goutte) : troisième, quatrième, cinquième semaines, bonne culture; sixième, huitième, treizième semaines, très bonne culture; vingtième semaine, bonne culture : quelques palmelloïdes.

*Deuxième repiquage* (1 goutte) : deuxième semaine en culture pauvre; troisième, quatrième, huitième, dixième, douzième semaines, bonne culture; dix-septième semaine, très bonne culture; vingtième semaine, décroissance.

*Troisième repiquage* (1 goutte) : quatrième et sixième semaines, culture pauvre; neuvième, treizième semaines, bonne culture; vingtième semaine, décroissance.

*Quatrième repiquage* : troisième semaine, bonne culture; huitième, dixième, treizième semaines, très bonne culture; quinzième semaine, bonne culture; dix-septième semaine, culture pauvre, beaucoup de palmelloïdes.

*Remarques* : Il y a dans le milieu au sulfate d'ammonium une forte acidification; par exemple, pH initial 7,0; après dix-sept semaines, pH 4,2.

Notons que Mainx (1928), dans un milieu à base de sulfate d'ammonium, a observé une acidification pouvant aller jusqu'à pH 3,8.

**SELS ORGANIQUES D'AMMONIUM.** — Nous avons pensé qu'il serait intéressant d'étudier la nutrition à la lumière d'*Euglena gracilis* dans des milieux où l'aliment azoté est l'ammonium, combiné non à des acides minéraux, mais à des acides organiques. Nous avons donc réalisé des milieux à l'acétate, lactate, succinate et citrate d'ammonium.

Au premier repiquage, tous ces sels organiques permettent

de très bonnes cultures, pas plus riches toutefois que dans les milieux au sulfate ou au phosphate d'ammonium.

Au deuxième repiquage, le citrate d'ammonium permet des cultures très pauvres. Le lactate, le succinate, l'acétate permettent toujours de bonnes cultures.

Même résultat aux troisième et quatrième repiquages.

Donc certains sels organiques (lactate, succinate, acétate) d'ammonium permettent de bonnes cultures d'*Euglena gracilis*. La valeur alimentaire des sels organiques d'ammonium n'est pas supérieure à celle des sels minéraux.

DISCUSSION ET CONCLUSION. — *Euglena gracilis* peut donc subir au moins quatre repiquages dans des milieux entièrement minéraux dans lesquels l'aliment azoté est soit un nitrate, soit un sel d'ammonium. Dans nos expériences, l'influence des traces de substances organiques, qu'apporte inmanquablement le premier ensemencement à partir d'un milieu organique, a été éliminée puisque nous avons poursuivi nos expériences, au moins jusqu'au quatrième repiquage, ce que n'a fait aucun de nos prédécesseurs.

Nous concluons donc de nos essais qu'*Euglena gracilis* est un organisme autotrophe — si nous définissons l'autotrophie par la nature minérale de l'aliment azoté —. Nous sommes donc parfaitement d'accord avec les conclusions de E. G. Pringsheim sur ce point. Mais là où nos conclusions diffèrent de celles de cet auteur, c'est sur la valeur comparative des divers aliments azotés.

Il résulte en effet de nos expériences :

1° Que le nitrate de calcium peut permettre la multiplication d'*Euglena gracilis*, au premier et au deuxième repiquages. Cette multiplication est cependant extrêmement faible, et le fait qu'au troisième repiquage elle est à peu près nulle nous permet de conclure que le développement observé au cours des premières cultures est dû à l'apport de substances nutritives et aux substances de réserve des flagellés introduites dans le milieu par l'ensemencement. Le nitrate de calcium ne permet donc pas l'entretien d'une culture d'*Euglena gracilis*.

2° Le nitrate de sodium et le nitrate de potassium permettent des cultures indéfiniment repiquables, mais pauvres.

3° Le nitrate d'ammonium permet des cultures plus riches.

4° Le phosphate d'ammonium et le sulfate d'ammonium permettent de très bonnes cultures.

Le tableau ci-dessous résume ces résultats :

*Euglena gracilis*. Nutrition minérale à la lumière.

NUMÉRO des repiquages	NITRATE de calcium	NITRATE de sodium	NITRATE de potassium	NITRATE d'ammonium	PHOSPHATE d'ammonium	SULFATE d'ammonium
I. . . . .	+	+	+	++	+++	+++
II. . . . .	±	+	+	++	+++	+++
III. . . . .	±	+	+	++	+++	+++
IV. . . . .		+	+	++	+++	+++

Les différents aliments azotés ont donc une valeur très inégale pour *Euglena gracilis*. Le nitrate de calcium est inutilisable, les sels nitriques utilisables, mais ne permettent que des cultures pauvres ; les sels d'ammonium sont très favorables.

Pringsheim (1913) avait conclu que les nitrates et les sels d'ammonium ont la même valeur nutritive. Il est probable que les résultats de ses expériences ont été troublés par le fait que Pringsheim n'a fait qu'un seul repiquage dans les milieux qu'il étudiait.

REMARQUE SUR LE FER. — Pour Mainx (1928), il n'est pas nécessaire d'ajouter de fer au milieu pour obtenir la culture d'*Euglena gracilis*. Cette conclusion méritait d'être vérifiée.

D'un milieu au nitrate d'ammonium, nous avons supprimé le chlorure ferrique. Au premier repiquage, bonne culture. Au deuxième repiquage, bonne culture exactement comparable à celles obtenues dans les milieux témoins avec Fe.

Il nous paraît dangereux de conclure qu'*Euglena gracilis* n'a pas besoin de Fe. On sait, depuis Raulin, que le fer est un des éléments constants, indispensable de la substance vivante. Et le fait qu'un organisme peut se multiplier quelque temps dans un milieu dans lequel on n'a pas ajouté de fer doit conduire, nous semble-t-il, à la conclusion que ce milieu contient des traces de fer. Ni dans les expériences de Mainx, ni dans

les nôtres, les produits chimiques utilisés n'avaient subi de purification spéciale en vue de la suppression du fer. L'interprétation des résultats doit donc être très prudente et toute provisoire.

#### NUTRITION ORGANIQUE.

Nous nous proposons d'étudier dans ce paragraphe la valeur alimentaire de quelques aliments organiques à la lumière.

On sait depuis Zumstein que la « peptone » convient parfaitement à *Euglena gracilis*. On sait aussi que l'asparagine est favorable et qu'*Euglena gracilis* peut assimiler certains acides aminés (Ternetz 1912, Mainx 1928).

Il nous a paru intéressant de reprendre cette question systématiquement et d'étudier comparativement, d'une part des acides aminés, d'autre part des « peptones diverses », et de comparer le développement dans ces milieux organiques à celui obtenu dans les milieux minéraux.

**Acides aminés.** — Pour ces expériences dans le milieu n° 1 (voir p. 574), on ajoutait les acides aminés à la concentration de 2 p. 1.000, sauf ceux qui n'étaient pas solubles à ce taux et qui étaient étudiés en solution saturée.

Les expériences ont été faites à pH 7,0.

A chaque repiquage, on ensemait plusieurs tubes de milieu (de 2 à 6). Tous les repiquages ont été effectués avec 1 goutte de culture.

**GLYCOCOLLE.** — Ensemencement avec 1 goutte d'une culture en milieu à l'alanine.

*Premier repiquage* (21 février). — Deuxième et troisième semaines : culture très pauvre ; quatrième, cinquième, sixième et septième semaines : cultures pauvres ; huitième et dixième semaines, bonnes cultures ; douzième semaine, décroissance.

*Deuxième repiquage* (7 avril). — Deuxième et quatrième semaines : cultures pauvres ; cinquième et septième semaines : bonnes cultures ; dixième semaine : quelques palmelloïdes ; dixième semaine : décroissance.

*Troisième repiquage* (21 avril). — Deuxième semaine : cultures pauvres ; troisième et quatrième semaines : bonnes cultures ; cinquième et septième semaines : décroissance ; dixième semaine : cultures très pauvres.

*Quatrième repiquage* (13 mai). — Deuxième, troisième et quatrième



semaines : cultures pauvres ; cinquième semaine : cultures pauvres ; les Euglènes diminuent de taille ; sixième, huitième et dixième semaines : décroissance ; quatorzième semaine : cultures très pauvres.

*Remarque* : Deux autres séries d'expériences ont donné les mêmes résultats. A la cinquième et à la dixième semaines, pas de changement de  $pH$ .

ALANINE DROITE. — Ensemencement avec 1 goutte de culture en milieu peptoné.

*Premier repiquage* (25 octobre). — Deuxième, troisième, quatrième et cinquième semaines : bonnes cultures ; à partir de la troisième semaine, quelques palmelloïdes.

*Deuxième repiquage* (15 novembre). — Deuxième et troisième semaines : cultures pauvres ; quatrième à treizième semaine : bonnes cultures ; quinzième semaine : décroissance ; dix-septième semaine : cultures pauvres.

*Troisième repiquage* (21 février). — Deuxième semaine : cultures très pauvres ; troisième semaine : cultures pauvres ; quatrième, cinquième et septième semaines : bonnes cultures.

*Quatrième repiquage* (21 mars). — Deuxième et troisième semaines : cultures pauvres ; quatrième et sixième semaines : bonnes cultures ; huitième semaine : cultures pauvres ; dixième semaine : cadavres.

*Remarque* : Deux autres séries ont donné les mêmes résultats.  $pH$  aux cinquième, sixième et dix-septième semaines : pas de changement (7,0).

VALINE RACÉMIQUE. — Ensemencement avec 1 goutte d'une souche en milieu à l'aniline.

*Premier repiquage* (21 février). — Deuxième semaine : cultures très pauvres ; troisième semaine : cultures pauvres ; quatrième, cinquième et sixième semaines : bonnes cultures.

*Deuxième repiquage* (21 mars). — Deuxième semaine : cultures pauvres ; troisième, quatrième, sixième et huitième semaines : bonnes cultures

*Troisième repiquage* (11 avril). — Deuxième semaine : cultures pauvres ; troisième, quatrième et cinquième semaines : bonnes cultures.

*Quatrième repiquage* (21 avril). — Deuxième semaine : cultures pauvres ; troisième, quatrième, cinquième et septième semaines : bonnes cultures ; dixième semaine : décroissance ; nombreuses formes palmelloïdes.

*Remarques* : Deux autres séries ont donné les mêmes résultats.  $pH$  : cinquième et dixième semaines, pas de changement (7,0).

**LEUCINE GAUCHE.** — Ensemencement avec I goutte d'une souche en milieu à l'aniline.

*Premier repiquage* (2 février). — Deuxième semaine : cultures très pauvres ; troisième semaine : cultures pauvres ; quatrième, cinquième et sixième semaines : bonnes cultures.

*Deuxième repiquage* (21 mars). — Deuxième semaine : cultures pauvres ; troisième, quatrième et cinquième semaines : bonnes cultures ; huitième semaine : décroissance.

*Troisième repiquage* (11 avril). — Deuxième et troisième semaines : cultures pauvres ; quatrième, cinquième, septième, neuvième, dixième et douzième semaines : bonnes cultures ; quatorzième semaine : décroissance ; dix-huitième semaine : cultures très pauvres ; vingtième semaine : cadavres.

*Quatrième repiquage* (21 avril). — Deuxième semaine : cultures très pauvres ; troisième, quatrième, cinquième et septième semaines : cultures pauvres ; dixième semaine : bonnes cultures ; treizième semaine : décroissance, quelques palmelloïdes ; dix-septième semaine : cultures très pauvres ; vingtième semaine : cadavres.

*Remarques* : Deux autres séries d'expériences : mêmes résultats. Pas de changement de pH : sixième et dix-septième semaines.

**SÉRINE RACÉMIQUE.** — Ensemencement avec I goutte d'une culture en milieu peptoné.

*Premier repiquage* (22 novembre). — Deuxième, troisième et quatrième semaines : cultures très pauvres ; douzième, treizième, quinzième et dix-septième semaines : bonnes cultures ; dix-huitième semaine : décroissance.

*Deuxième repiquage* (21 février). — Deuxième et troisième semaines : cultures très pauvres ; quatrième et cinquième semaines : bonnes cultures ; sixième semaine : très bonnes cultures.

*Troisième repiquage* (21 mars). — Deuxième semaine : cultures pauvres ; troisième, quatrième et sixième semaines : bonnes cultures ; huitième semaine : décroissance ; dixième semaine : cultures très pauvres.

*Quatrième repiquage* (11 avril). — Deuxième semaine : cultures très pauvres ; troisième semaine : cultures pauvres ; quatrième et cinquième semaines : décroissance ; septième semaine : cadavres.

*Remarques* : Une autre série d'expériences : mêmes résultats.

Pas de changement du pH : sixième et dix-huitième semaines.

**PHÉNYLALANINE RACÉMIQUE.** — Ensemencement avec I goutte d'une culture en milieu peptoné.

*Premier repiquage* (22 novembre). — Deuxième semaine, cultures très pauvres ; troisième et quatrième semaines, cultures pauvres ; douzième,

treizième et quinzième semaines, bonnes cultures ; dix-septième semaine. décroissance.

*Deuxième repiquage* (21 février). — I et II gouttes, négative jusqu'à la sixième semaine ; avec III gouttes : deuxième, troisième, quatrième et cinquième semaines, cultures très pauvres ; sixième semaine, cultures pauvres ; septième, huitième et dixième semaines, bonnes cultures ; douzième semaine, décroissance.

*Troisième repiquage* (7 avril). — Deuxième semaine, cultures pauvres ; quatrième et cinquième semaines, bonnes cultures ; septième semaine, cultures très pauvres.

*Quatrième repiquage* (21 avril). — Deuxième semaine, cultures pauvres ; troisième, quatrième, cinquième et septième semaines, bonnes cultures ; dixième semaine, cadavres.

*Remarques* : Une autre série : mêmes résultats.

Pas de changement du  $pH$  : dixième et dix-septième semaines.

**TYROSINE GAUCHE.** — Ensemencement avec I goutte d'une culture en milieu peptoné.

*Premier repiquage* (17 mars). — Première semaine, cultures pauvres ; deuxième et troisième semaines, bonnes cultures ; quatrième semaine, formes morbides ; septième et dixième semaines, cultures pauvres.

*Deuxième repiquage* (8 mai). — Deuxième, troisième et quatrième semaines, cultures pauvres ; cinquième semaine, décroissance ; sixième semaine, cadavres.

*Troisième repiquage* (29 mai). — Deuxième semaine, cultures pauvres ; troisième et quatrième semaines, cultures très pauvres.

*Quatrième repiquage* (12 avril). — Deuxième semaine, cultures pauvres, euglènes immobiles ; troisième et quatrième semaines, cultures très pauvres.

*Remarques* : Une autre série d'expériences : mêmes résultats.

Pas de changement du  $pH$  à la dix-septième semaine.

**TRYPTOPHANE GAUCHE.** — Ensemencement avec I goutte d'une culture en milieu peptoné.

1<sup>re</sup> série :

*Premier repiquage* (17 mars). — Première semaine, cultures pauvres ; deuxième, troisième et quatrième semaines, bonnes cultures ; septième semaine, cadavres.

*Deuxième repiquage* (7 avril). — Deuxième semaine, cultures très pauvres ; quatrième semaine, cadavres.

2<sup>e</sup> série : souche en milieu à la proline, I goutte.

*Premier repiquage* (8 mai). — Deuxième semaine, cultures très pauvres ; troisième semaine, cadavres.

**HISTIDINE (MONOCHLORHYDRATE).** — Ensemencement avec I goutte d'une culture en milieu peptoné.

*Premier repiquage* (17 mars). — Première semaine, cultures pauvres; deuxième semaine, bonnes cultures; troisième et quatrième semaines, très bonnes cultures; septième semaine, cultures pauvres.

*Deuxième repiquage* (7 avril). — Deuxième semaine, cultures pauvres; quatrième et cinquième semaines, bonnes cultures; septième semaine, décroissance.

*Troisième repiquage* (21 avril). — Deuxième semaine, cultures pauvres; troisième et quatrième semaines, bonnes cultures; cinquième semaine, très bonnes cultures; septième semaine, décroissance; dixième semaine, cultures très pauvres.

*Quatrième repiquage* (13 mai). — Deuxième semaine, cultures très pauvres; troisième et quatrième semaines, cultures pauvres; cinquième semaine, décroissance.

*Remarques* : pH, dixième semaine; pH, 6,6.

**ARGININE DROITE (basique).** — Ensemencement avec I goutte d'une culture en milieu peptoné.

*Premier repiquage* (17 mars). — Première et deuxième semaines, cultures pauvres; troisième semaine, bonnes cultures; quatrième semaine, décroissance; septième semaine, cultures très pauvres.

*Deuxième repiquage* (7 avril). — Deuxième et quatrième semaines, cultures très pauvres; cinquième semaine, cultures pauvres; septième, dixième et douzième semaines, bonnes cultures; après dixième semaine, quelques palmelloïdes; treizième semaine, décroissance; quatorzième semaine, cultures pauvres, très peu de formes flagellées.

*Troisième repiquage* 1<sup>o</sup> (13 mai). — Deuxième, troisième, quatrième et cinquième semaines, rien.

2<sup>o</sup> (5 juin). — Deuxième et quatrième semaines, 0.

2<sup>e</sup> série : avec I goutte, souche en milieu à la proline.

(8 mai). — Deuxième, troisième et quatrième semaines, cultures très pauvres; cinquième semaine, cadavres. Tous morts et tombés au fond du tube.

**LYSINE DROITE.** — 1<sup>re</sup> série, souche en milieu peptoné 5C, I goutte.

*Premier repiquage* (17 mars). — Première, deuxième, troisième, quatrième et septième semaines, cultures très pauvres.

2<sup>e</sup> série, souche en milieu à la proline, I goutte.

*Premier repiquage* (8 mai). — Deuxième, troisième, quatrième, cinquième, sixième et huitième semaines, cultures très pauvres.



*Remarques* : *Euglena stellata* ensemencé dans le même milieu a donné des cultures. Il ne peut donc être question ici de toxicité de la lysine.

**PROLINE RACÉMIQUE.** — Ensemencement avec 1 goutte d'une culture en milieu peptoné.

*Premier repiquage* (17 mars). — Première semaine, cultures pauvres; deuxième, troisième et quatrième semaines, bonnes cultures; septième semaine, décroissance.

*Deuxième repiquage* (11 avril). — Deuxième semaine, cultures pauvres; troisième, quatrième et cinquième semaines, bonnes cultures.

*Troisième repiquage* (21 avril). — Deuxième semaine, cultures pauvres; troisième, quatrième et cinquième semaines, bonnes cultures; septième semaine, décroissance, nombreuses formes palmelloïdes; dixième semaine, cultures très pauvres, à l'état uniquement palmelloïde.

*Quatrième repiquage* (8 mai). — Deuxième, troisième et quatrième semaines, cultures pauvres; cinquième, sixième et huitième semaines, cultures très pauvres.

*Remarques* : Pas de changement du pH, huitième et dixième semaines.

**ACIDE ASPARTIQUE.** — Ensemencement avec 1 goutte d'une souche en milieu peptoné.

*Premier repiquage* (22 novembre). — Deuxième, troisième et quatrième semaines, cultures pauvres; douzième et treizième semaines, bonnes cultures, quelques palmelloïdes; quinzième semaine, décroissance.

*Deuxième repiquage* (21 février). — Deuxième semaine, quelques formes flagellées; troisième et quatrième semaines, cultures pauvres; cinquième semaine, bonnes cultures; sixième semaine, décroissance.

*Troisième repiquage* (2 mars). — Deuxième semaine, cultures pauvres; troisième, quatrième et sixième semaines, bonnes cultures; huitième semaine, décroissance.

*Quatrième repiquage* (11 avril). — Deuxième semaine, quelques formes flagellées; troisième, quatrième et cinquième semaines, cultures pauvres; septième semaine, cadavres.

*Remarques* : Une autre série d'expériences, mêmes résultats. Pas de changement du pH, sixième et quinzième semaines.

**ACIDE GLUTAMIQUE** — Souche en milieu à l'acide aspartique.

*Premier repiquage* (21 février). — Deuxième et troisième semaines, cultures très pauvres; quatrième, cinquième et sixième semaines, bonnes cultures.

*Deuxième repiquage* (2 avril). — Deuxième semaine, cultures pauvres; troisième, quatrième et sixième semaines, bonnes cultures; huitième semaine, décroissance.

*Troisième repiquage* (11 avril). — Deuxième semaine, cultures très pauvres; troisième et quatrième semaines, bonnes cultures; cinquième semaine, décroissance; septième semaine, cadavres.

*Quatrième repiquage* (8 mai). — Deuxième, troisième et quatrième semaines, cultures pauvres; cinquième semaine, décroissance; sixième semaine, très peu de flagellés.

*Remarques* : Deux autres séries d'expériences ont donné les mêmes résultats.

Pas de changement de pH, sixième semaine.

**ASPARAGINE GAUCHE.** — Souche en milieu à l'acide aspartique.

*Premier repiquage* (21 février). — Deuxième et troisième semaines, cultures très pauvres; quatrième semaine, cultures pauvres; cinquième et sixième semaines, bonnes cultures.

*Deuxième repiquage* (21 mars). — Deuxième semaine, cultures pauvres; troisième semaine, bonnes cultures; quatrième, sixième et huitième semaines, très bonnes cultures; dixième semaine, décroissance.

*Troisième repiquage* (11 avril). — Deuxième semaine, cultures pauvres; troisième et quatrième semaines, très bonnes cultures; cinquième semaine, décroissance.

*Quatrième repiquage* (21 avril). — Deuxième semaine, cultures pauvres; troisième, quatrième, cinquième et septième semaines, très bonnes cultures; dixième semaine, décroissance.

*Remarque* : Ces expériences ont été reprises 8 fois. Suivant les échantillons d'asparagine, les cultures ont été bonnes ou très bonnes, mais le développement a toujours été meilleur avec l'asparagine qu'avec les autres acides aminés. Toutefois l'asparagine donne des résultats moins favorables que les peptones qui seront étudiées ultérieurement.

**DISCUSSION.** — D'après Ternetz, le glyocolle, l'alanine et l'asparagine constituent des aliments azotés favorables pour *Euglena gracilis*; la leucine est défavorable. Pour Mainx, la glyocolle, la leucine, l'acide glutamique et l'asparagine ne permettent que des cultures pauvres.

Pour nous, l'alanine, la valine, la leucine, le phénylalanine, l'histidine et l'asparagine constituent de bons aliments azotés pour *Euglena gracilis*. Le glyocolle, la sérine, la proline, l'acide aspartique, l'acide glutamique sont utilisables, mais ne permettent que des cultures pauvres, cependant repiquables en série jusqu'au quatrième repiquage.

La tyrosine ne permet que des cultures extrêmement pauvres : elle est pratiquement inutilisable.

La tryptophane, l'arginine, la lysine sont inutilisables.

Nous reviendrons sur ces résultats lorsque nous comparerons la nutrition azotée d'*Euglena gracilis* à celle des autres Euglènes. Nous verrons en particulier que la possibilité d'utilisation de certains acides aminés varie avec l'espèce envisagée.

**Peptones.** — Nous avons étudié les peptones suivantes :

- 1° Peptone pepsique de viande de bœuf ;
- 2° Peptone pepsique d'arachide ;
- 3° Peptone pancréatique de viande de cheval ;
- 4° Peptone pancréatique de viande et de panse de cheval ;
- 5° Peptone pancréatique de viande de bœuf (digestion peu poussée, 5 C.).
- 6° Peptone pancréatique de viande de bœuf. Hydrolyse très poussée (M.B.T.A.).
- 7° Peptone de soie (hydrolyse alcaline de la sérine de la soie).

Ces peptones ont été ajoutées au milieu n° 1 (v. p. 574), à la concentration de 2 p. 1.000. Toutes ces peptones donnent d'excellents résultats : multiplication rapide aboutissant à des cultures très riches.

Avec chacune de ces peptones, nous avons fait plusieurs séries d'essais qui ont toujours donné des résultats constants.

Pour l'entretien des cultures, nous nous sommes servi, au début, d'un milieu peptoné à base de peptone pancréatique M.B.T.A. Actuellement, nous utilisons simplement de l'eau peptonée.

Eau distillée . . . . .	1.000
Peptone 5 c. . . . .	4
NaOH, q. s. pour pH. . . . .	7

**INFLUENCE DE LA CONCENTRATION.** — Nous avons réalisé des solutions de peptone de titres variables :

	GRAMMES de peptone pour 1.000 cent. cubes de milieu
Pas de culture . . . . .	100
Très bonnes cultures . . . . .	10
Très bonnes cultures . . . . .	2
Très bonnes cultures . . . . .	1
Cultures pauvres . . . . .	0,1
Pas de culture . . . . .	0,01

Donc, les concentrations de 1 à 10 p. 1.000 sont très favorables.

D'après Zumstein et Ternetz, *Euglena gracilis* se décolore à la lumière par culture en milieu peptoné concentré. Nous n'avons jamais observé de décoloration, dans ces conditions, de la souche de Prague avec laquelle nous avons expérimenté.

DISCUSSION. — Pour Pringsheim la nutrition aux dépens de sels minéraux dans des conditions favorables donne d'aussi bons résultats que la nutrition aux dépens de corps azotés organiques. Il est évident que les conditions physiques, et en premier lieu l'éclairement, jouent dans l'appréciation de la valeur nutritive des composés azotés minéraux un rôle très important, mais nous avons réalisé durant plusieurs années, et ce, pendant l'année entière, des expériences comparatives sur la valeur de la nutrition azotée minérale ou organique pour *Euglena gracilis*.

Nous avons vu (v. p. 580) que les différents sels azotés ont une valeur nutritive très différente, et qu'alors que les nitrates ne permettent qu'une culture pauvre, les sels d'ammonium sont d'excellents aliments azotés.

Les acides aminés étudiés permettent, suivant les cas, des cultures moins bonnes ou équivalentes aux sels d'ammonium. Quant aux peptones, elles donnent des résultats excellents, des cultures rapides et très denses. Le développement est *toujours* plus rapide et la densité plus grande qu'avec les sels d'ammonium. Mainx (1928) est arrivé aux mêmes résultats. L'interprétation qu'il donne de ce fait est la suivante : il y aurait, dans les sels d'ammonium et les acides aminés qu'il a étudiés, des traces de produits toxiques (métaux lourds).

Pour nous, la question de la valeur nutritive des sels d'ammonium, des acides aminés et des peptones doit être envisagée d'un autre point de vue. La nutrition aux dépens d'un seul acide aminé revient à une nutrition aux dépens d'un sel d'ammonium; l'acide aminé fourni étant préalablement désaminé et l'organisme faisant la synthèse de tous les acides aminés à partir du groupement  $\text{NH}_2$  et des acides organiques correspondants synthétisés.

Avec la peptone il en est tout autrement : les peptones étant des mélanges complexes de protéine, de polypeptides plus ou



moins complexes et d'acides aminés, il est probable que l'organisme assimile directement les acides aminés et peptides et que le travail qu'il a fourni pour sa protéosynthèse est ainsi beaucoup moins considérable que celui nécessaire lorsque l'aliment est un sel d'ammonium ou un sel acide aminé.

Il faut chercher là, croyons-nous, la raison du développement plus rapide obtenu dans les milieux peptonés.

Il n'en reste pas moins que, conformément aux conclusions de Ternetz, Pringsheim et Mainx, *Euglena gracilis* peut parfaitement se développer dans un milieu purement minéral.

### Nutrition à l'obscurité.

#### HISTORIQUE.

En 1899, Zumstein montre qu'*Euglena gracilis* peut se multiplier à l'obscurité en milieu peptoné, ce que confirment Ternetz (1912), Pringsheim (1913) et Mainx (1928). Mais ces auteurs n'ont pas poursuivi leurs expériences assez longtemps pour obtenir une race « physiologiquement stable » d'*Euglena gracilis*.

Nous verrons que cette stabilité physiologique n'est réalisée qu'après plusieurs mois de vie à l'obscurité, et ce n'est que lorsqu'elle est établie que l'on peut étudier son pouvoir de synthèse.

Toutes les expériences qui sont décrites ici ont été effectuées en collaboration avec A. Lwoff. Il s'agissait de déterminer le pouvoir de synthèse d'*Euglena gracilis* à l'obscurité, c'est-à-dire après suppression de la fonction chlorophyllienne. Les principaux résultats ont été exposés dans deux notes préliminaires [A. Lwoff et H. Dusi (1929 et 1931)] et dans le mémoire de A. Lwoff (1932).

#### MILIEU D'ENTRETIEN.

Nous basant sur les conclusions de Zumstein, nous nous attendions à obtenir d'emblée, à l'obscurité, dans les milieux peptonés, de belles cultures d'*Euglena gracilis*. Nos premiers essais furent décevants.

Dans un milieu où la source azotée était représentée par du muscle de bœuf ayant subi une digestion pancréatique très poussée, nous n'obtenions que des cultures très pauvres.

Nous avons alors pensé qu'une source carbonée indépendante pouvait être indispensable et nous avons constitué le milieu suivant :

Sulfate de magnésium . . . . .	0,25
Phosphate acide de potassium . . . . .	0,25
Chlorure de potassium . . . . .	0,25
Perchlorure de fer . . . . .	0,0025
Acétate de sodium . . . . .	2
Peptone de muscle de bœuf (très hydrolysée) . . . . .	2
Eau bi-distillée. . . . .	1.000
NaOH, g. s. pour pH . . . . .	7

A l'obscurité, *Euglena gracilis* se multiplie abondamment dans ce milieu. Une souche y a donc été régulièrement entretenue. Au bout de quelques mois, toutefois, la peptone très hydrolysée a été remplacée par une autre peptone résultant du début de digestion pancréatique du muscle (5 C.). A cette modification près, c'est donc dans ce milieu qu'*Euglena gracilis* est entretenue depuis trois ans et demi : janvier 1929 à juillet 1932. Les repiquages sont faits tous les mois. Les tubes, renfermant de 10 à 12 cent. cubes de milieu,ensemencés avec 1 goutte d'une culture, montrent, à la fin de la troisième semaine, une culture dense ne présentant que des formes flagellées, jusqu'à 250 par millimètre cube. Les formes flagellées se maintiennent pendant deux mois environ, puis apparaissent les formes palmelloïdes, lesquelles, au début, présentent des formes de division. Dans les cultures très anciennes, les seuls éléments vivants sont les palmelles disposées en anneau sur le verre, juste au-dessous de la surface du liquide.

Nous avons été obligé, pour la clarté de l'exposé, de diviser en deux parties les résultats relatifs au pouvoir de synthèse, les résultats obtenus pendant les dix premiers mois et ceux obtenus après trente mois de culture à l'obscurité différant sensiblement. Nous exposons d'abord les résultats obtenus pendant les premiers mois de culture à l'obscurité.

POUVOIR DE SYNTHÈSE  
PENDANT LE PREMIER MOIS DE CULTURE A L'OBSCURITÉ.

Nous avons utilisé le milieu suivant :

Sulfate de magnésium . . . . .	0,25
Phosphate acide de sodium. . . . .	0,25
Chlorure de potassium. . . . .	0,25
Perchlorure de fer . . . . .	0,0025
Eau bi-distillée. . . . .	1.000

Ce milieu est additionné de divers corps azotés et carbonés et ajusté à pH 7,0 par addition de soude.

Milieu minéral + asparagine = pas de culture du tout.

Milieu minéral + asparagine + acétate de sodium = premier, deuxième et troisième repiquages, cultures lentes et pauvres. Il se forme à la surface du milieu un voile de formes palmelloïdes. Il n'y a pas, ou il y a de très rares flagellés. Au quatrième repiquage, pas de culture.

Milieu minéral + soie hydrolysée = culture lente et pauvre.

Milieu minéral + soie hydrolysée + acétate de sodium = très bonnes cultures; une souche a été entretenue dans ce milieu du 29 mai au 9 novembre 1929, soit un peu plus de cinq mois, temps pendant lequel il a été effectué sept repiquages : 1<sup>er</sup> et 29 mai, 2 et 25 juin, 17 juillet, 15 août, 10 septembre, 10 octobre, 9 novembre.

Milieu minéral + muscle hydrolysé (digestion pancréatique très poussée) = cultures lentes et pauvres, repiquables en série.

Milieu minéral + muscle hydrolysé (digestion pancréatique très poussée) + acétate de sodium = très bonnes cultures.

Milieu minéral + muscle hydrolysé (digestion pepsique, début) = bonnes cultures : neuf repiquages ont été effectués du 26 avril au 9 novembre : 26 avril, 5 mai, 4 juillet, 17 juillet, 15 août, 10 septembre, 10 octobre, 9 novembre.

Milieu minéral + muscle hydrolysé (digestion pepsique, début) + acétate de sodium = cultures très riches.

A la lumière, tous ces milieux, avec ou sans acétate de sodium, permettent naturellement des cultures très riches. Nous avons toujours essayé à la lumière les milieux donnant des résultats négatifs à l'obscurité, afin de vérifier que l'absence de développement n'est pas due à la toxicité du milieu.

Il résulte de ces expériences que, seul le muscle peu dégradé (digestion pepsique peu poussée), riche en polypeptides, a permis la culture à l'obscurité sans source carbonée indépendante. Cependant, l'addition d'acétate de sodium améliore toujours sensiblement le rendement des cultures. Les produits

d'hydrolyse plus poussée des protides, muscle ayant subi une digestion pancréatique prolongée, sérine de la soie hydrolysée par la chaux, ne permettent à eux seuls qu'une multiplication très lente. L'adjonction d'acétate de sodium aux milieux renfermant ces « peptones » permet des cultures très riches.

ESSAI D'OBTENTION D'UN MILIEU SYNTHÉTIQUE. — Le fait d'avoir obtenu trois repiquages successifs en milieu à l'asparagine + acétate de sodium, le fait aussi d'avoir obtenu de fort belles cultures en milieu à la soie hydrolysée + acétate de sodium, nous a porté à supposer qu'il suffirait d'ajouter quelques composés simples au milieu de l'asparagine + acétate de sodium pour y permettre le développement indéfini des cultures d'*Euglena gracilis* à l'obscurité.

Nous avons alors ajouté, au milieu minéral + asparagine + acétate de sodium, des acides aminés ou des mélanges d'acides aminés.

Les expériences réalisées ont été exposées en détail dans le mémoire de Lwoff (1932) et nous croyons inutile d'y revenir ici. Qu'il nous suffise de dire que tous les essais d'obtention de culture dans ces milieux à base d'acides aminés ou en mélange ont donné des résultats négatifs.

#### RACE STABLE A L'OBSCURITÉ.

Ces expériences furent interrompues momentanément et reprises en janvier 1931. La nouvelle série d'expériences dura six mois (janvier à juillet 1931).

Les milieux utilisés furent les mêmes que dans les premiers essais.

Milieu minéral + asparagine = 0.

Milieu minéral + asparagine + acétate de sodium = 0

Milieu minéral + soie hydrolysée = 0.

Milieu minéral + soie hydrolysée + acétate de sodium = 0.

Milieu minéral + peptone pancréatique de muscle = 0.

Milieu minéral + peptone pancréatique de muscle + acétate de sodium = très bonnes cultures.

Milieu minéral + peptone pepsique de muscle = 0.

Les différences avec les résultats de 1929 sont bien mises en évidence dans le tableau ci-après.



Nous voyons donc qu'une source carbonée indépendante (acide acétique) est devenue indispensable au développement des cultures, absence de culture en peptone pancréatique de muscle qui avait permis en 1929 une culture pauvre mais repiquable, et surtout en peptone pepsique de muscle qui avait permis neuf repiquages.

D'après Mary E. ELMORE (1928 *a* et *b*), la valeur antigène de *Euglena gracilis* cultivée à l'obscurité ou à la lumière est différente. Le choc anaphylactique chez le cobaye sensibilisé à *Euglena gracilis* cultivée soit à la lumière, soit à l'obscurité, n'est déclenché que par l'injection des cultures homologues.

*Euglena gracilis*. Nutrition azotée et nutrition carbonée.

	NITRATES	SELS D'AMMONIUM	ASPARAGINE	ASPARAGINE + Acétate de Na	SOIE HYDROLYSÉE	SOIE HYDROLYSÉE + Acétate de Na	PEPTONE PANCRÉATIQUE (muscle)	PEPTONE PANCRÉATIQUE + Acétate de Na	PEPTONE PEPSIQUE (muscle)	PEPTONE PEPSIQUE + Acétate de Na	PEPTONE PEPSIQUE (arachide)	PEPTONE PEPSIQUE (arachide) + Acétate de Na
Lumière. . . .	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Premier mois à l'obscurité. .	0	0	0	0	±	++	±	++	++	++		
Race stable à l'obscurité. .	0	0	0	0	0	0	0	++	0	++	0	++

Donc, nécessité d'une source carbonée organique indépendante. De plus, la soie hydrolysée qui permettait, additionnée d'acétate de sodium, d'obtenir des développements abondants, est devenue inutilisable. Seules, permettent la culture, les peptones pancréatique et pepsique de muscle. Ce sont précisément ces peptones qui sont nécessaires et suffisantes au cilié *Glaucoma piriformis* (A. Lwoff, 1923-1932) et au flagellé trypanosomide *Strigomonas oncopelti* (M. Lwoff, 1928-1929).

Au point de vue de ses besoins azotés, *Euglena gracilis*, après trente mois de vie à l'obscurité, se comporte donc exactement comme *Glaucoma piriformis* (A. Lwoff et H. Dusi, 1931).

## NUTRITION CARBONÉE.

Nous avons vu qu'une source carbonée indépendante est devenue indispensable. Dans nos premiers essais, le composé carboné était représenté par l'acide acétique, donné sous forme de son sel de sodium.

Nous avons essayé de remplacer l'acide acétique par les sels de sodium des acides suivants :

- 1<sup>o</sup> Acides lactique,  
malique,  
tartrique,  
pyruvique,  
citrique,  
succinique,  
glycéro-phosphorique.

Aucun de ces acides n'a pu servir d'aliment carboné (A. Lwoff et H. Dusi, 1931).

- 2<sup>o</sup> Acides acétique,  
propionique,  
butyrique normal,  
isobutyrique,  
valérianique normal,  
caproïque normal,  
diéthylacétique,  
heptylique normal,  
octylique normal.

Certains de ces acides permettent des cultures très riches contenant jusqu'à 250 flagellés par millimètre cube (nous donnons les résultats de numérations effectuées au cinquième repiquage). Ce sont les acides acétique, butyrique normal et caproïque normal.

Avec les acides propionique et valérianique normal, on a des cultures de densité moindre, 35 à 140 flagellés par millimètre cube.

Les acides isobutyrique et diéthylacétique permettent, au premier repiquage, une culture très lente et très pauvre, plutôt une survie qu'un développement, et non repiquable.

Les acides heptylique normal et octylique normal ne permettent pas du tout la multiplication des Euglènes.

On voit donc que les seuls acides pouvant servir d'aliment carboné à *Euglena gracilis* sont les acides de la série grasse à chaîne linéaire, dont la molécule renferme moins de 7 atomes de carbone. Les plus favorables sont ceux qui ne renferment pas de groupement CH (acide acétique), ou qui renferment un nombre pair, 2 : acide butyrique, ou 4 : acide caproïque normal. Ceux qui renferment un nombre impair de groupements CH, un seul : acide propionique, ou 3 : acide valérianique normal, peuvent servir d'aliment carboné, mais sont moins favorables que les précédents. Enfin, la forme isomère de l'acide butyrique, l'acide isobutyrique et l'acide diéthylacétique, isomère de l'acide caproïque, sont inutilisables.

Nous avons essayé d'autre part de remplacer l'acide acétique par divers composés organiques : alcools, glucides : glycérine-mannite-glucose-saccharose. Les résultats ont été complètement négatifs (expérience inédite avec A. Lwoff).

Nous avons de nouveau étudié comparativement les besoins carbonés d'*Euglena gracilis*, d'une part d'une souche toujours entretenue à la lumière, d'autre part d'une souche entretenue depuis trois ans à l'obscurité et ayant apparemment perdu toute sa chlorophylle.

Ces deux souches ont étéensemencées dans le même milieu peptoné, à base de peptone pancréatique de viande de bœuf (viande ayant subi un début de digestion). Le milieu ne contenait pas d'acide gras.

Dans ces conditions, la souche verte donne des cultures à l'obscurité; la souche entretenue à l'obscurité n'en donne pas. Cette nouvelle expérience vérifie donc pleinement nos expériences antérieures et nos conclusions :

Une souche verte d'*Euglena gracilis* se multiplie parfaitement en milieu peptoné (peptone peu dégradée) au début de sa vie à l'obscurité (A. Lwoff et H. Dusi, 1931).

Ce n'est que lorsqu'est réalisée la stabilité physiologique que se montre le besoin d'acide gras (A. Lwoff et H. Dusi, 1931).

Il est donc tout à fait logique de conclure que l'oxytrophie est liée à la présence de plaste et à l'absence de chlorophylle (A. Lwoff, 1932).



*Euglena gracilis*. Nutrition carbonée à l'obscurité.

	ALIMENT AZOTÉ peptone
Acide acétique . . . . .	—
Acide propionique . . . . .	++
Acide butyrique normal . . . . .	++
Acide isobutyrique . . . . .	0
Acide valérianique normal . . . . .	+
Acide caproïque normal . . . . .	++
Acide heptylique normal . . . . .	0
Acide octylique normal . . . . .	0
Acide pyruvique . . . . .	0
Acide lactique . . . . .	0
Acide tartrique . . . . .	0
Acide malique . . . . .	0
Acide succinique . . . . .	0
Acide citrique . . . . .	0
Acide glycéro-phosphorique . . . . .	0
Glycérine . . . . .	0
Mannite . . . . .	0
Glucose . . . . .	0
Saccharose . . . . .	0

En résumé, après trente mois de vie à l'obscurité, il faut fournir à *Euglena gracilis* :

1° Pour sa nutrition azotée, les mêmes peptones complexes, produits d'hydrolyse pepsique ou trypsique de muscle nécessaires aux organismes métatrophes;

2° Pour sa nutrition carbonée, un acide de la série grasse à chaîne linéaire renfermant dans sa molécule moins de 7 atomes de carbone et de préférence un nombre pair de groupements  $\text{CH}^2$ .

## Conclusions générales.

La discussion et les conclusions générales qui se dégagent de l'étude d'*Euglena gracilis* sont reportées à la deuxième partie de ce mémoire, qui paraîtra dans un des prochains fascicules de ces *Annales*.

L'index bibliographique est également reporté à cette deuxième partie.

Le Gérant : G. MASSON.



